

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'état)

PAR

Jean-Marie PELT

Pharmacien

Licencié ès-sciences

Diplômé du Centre de Préparation à l'Administration des Entreprises

Lauréat de la Faculté de Pharmacie et de l'Université de NANCY

Lauréat de l'Académie de Stanislas

Assistant-Délégué-chef de Travaux Pratiques

né le 24 Octobre 1933, à THIONVILLE (Moselle)

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude
des huiles de chaulmoogra Africaines

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 26 Octobre 1959 devant la Commission d'Examen

M^{elle} FRANÇOIS *PRÉSIDENT*

M^{elle} BESSON
M^r MEUNIER } *EXAMINATEURS*

1959

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Doctorat d'état)

PAR

Jean-Marie PELT

Pharmacien

Licencié ès-sciences

Diplômé du Centre de Préparation à l'Administration des Entreprises

Lauréat de la Faculté de Pharmacie et de l'Université de NANCY

Lauréat de l'Académie de Stanislas

Assistant-Délégué-chef de Travaux Pratiques

né le 24 Octobre 1933, à THIONVILLE (Moselle)

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'étude
des huiles de chaulmoogra Africaines

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 26 Octobre 1959 devant la Commission d'Examen

M^{lle} FRANÇOIS *PRÉSIDENT*

M^{lle} BESSON

M^r MEUNIER

} *EXAMINATEURS*

UNIVERSITÉ DE NANCY – FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE

N'

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle FRANCOIS M. Th.	Matière Médicale
MM. KAYSER F.	Chimie
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J. G.	Microbiologie
STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
BLOCH J. M.	Toxicologie
SOLEIL J.	Pharmacie chimique
BERNANOSE A.	Physique
Mlle BESSON S.	Pharmacodynamie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. BENE R.	Microbiologie
------------	---------------

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M. MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM. KAYSER F.	Biochimie technique
FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J. G.	Parasitologie
STEIMETZ E.	Mycologie-Minéralogie
BLOCH J. M.	Chimie Minérale
SOLEIL J.	Chimie organique
BERNANOSE A.	Optique et Acoustique
GRANGER (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
Mlle BESSON S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses
MM. BENE R.	Bactériologie
ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels
Mme LASSEUR A.	Techniques spéciales d'analyses bactériologiques
MM. MIRJOLET M.	Chimie analytique
PIERFITTE M.	C. E. S. Chimie Biologique

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANZIANI P.	Chimie
Mme LASSEUR A.	Microbiologie-Parasitologie
MM. MIRJOLET M.	Sciences pharmaceutiques
PIERFITTE M.	Chimie biologique
VILLOUTREIX J. (délégué)	Micrographie
PELT J. M. (délégué)	Chimie
Mlle GIRARD Th. (déléguée)	Microbiologie

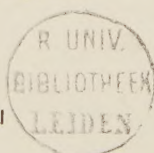
Doyen honoraire

M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier.

Professeurs honoraires

M. CORDEBARD
M. DOURIS

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.



A MES PARENTS

en témoignage d'affectueuse
reconnaissance.

A MES AMIS

en gage de notre profonde
communauté de cœur et d'esprit.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MADemoiselle MARIE-THERESE FRANCOIS
Professeur de Matière Médicale

A NOS JUGES

MONSIEUR MEUNIER
Professeur de Pharmacie Galénique

MADemoiselle BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

A TOUS NOS MAITRES
des Facultés de PHARMACIE
des SCIENCES
de DROIT
de NANCY

Hommage respectueux
et reconnaissant.

A tous les membres du Service de Santé des Troupes Coloniales, Médecins et Pharmaciens, qui par leur dévouement ont joué un rôle important dans le développement des moyens de lutte contre la lèpre.

A Roger et Elisabeth LEHMAN, mes compatriotes Mosellans, qui ont quitté leur pays et leurs amis, pour se mettre au service des lépreux de la Mission des Pères Capucins à MADAGASCAR.

Humble témoignage de
mon admiration.

*"Une thèse est à mes yeux, plus
encore qu'une œuvre intellectuelle,
une œuvre humaine".*

Emmanuel Mounier



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre l'exposé de ce travail, il m'est particulièrement agréable, non pour satisfaire aux exigences d'une tradition, mais par libre mouvement du cœur, de pouvoir exprimer ici mes sentiments de reconnaissance envers tous ceux qui m'ont permis la réalisation de cette thèse.

Lorsque Mademoiselle le Professeur Marie-Thérèse FRANCOIS m'accueillit dans son laboratoire, ce fut avec joie et émotion que je venais m'insérer dans l'immense mouvement qui depuis toujours, porte les hommes à répondre aux questions que leur pose l'apparente complexité des choses. J'aimais la recherche et j'attendais depuis longtemps cet instant où je devenais le disciple du Maître dont j'avais été l'élève durant mes études à la Faculté de Pharmacie. Les barrières tombaient, les distances s'évanouissaient et j'allais pouvoir enfin, grâce à une expérience lentement acquise, passer de la froide théorie des choses apprises au domaine si passionnant de la recherche et des sciences vivantes.

Que Mademoiselle FRANCOIS trouve ici l'expression de mon immense reconnaissance. Elle a su développer en moi à la fois l'esprit de recherche et le goût de l'enseignement et du contact humain. Ses conseils éclairés, témoignant de sa très grande compétence scientifique, du champ très vaste de ses connaissances et de ses hautes qualités morales et humaines ne m'ont jamais fait défaut.

Ma reconnaissance va également tout entière à Monsieur le Doyen KAYSER car, en me confiant un poste d'Assistant puis de Délégué aux travaux pratiques de Chimie, il m'a permis, en assurant ma situation professionnelle, d'entreprendre un travail de recherche, l'esprit libéré de tout souci matériel. Je n'aurais garde d'oublier tant de conversations, au cours desquelles j'ai toujours pu mesurer son dévouement et son zèle au service de notre Faculté, ainsi que sa grande sollicitude à mon égard.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur MEUNIER qui a bien voulu accepter de juger cette thèse, car l'étroite parenté entre la matière médicale et la pharmacie galénique me portait tout naturellement à solliciter ses conseils et sa présence dans mon Jury.

Mademoiselle BESSON m'a toujours réservé un très sympathique accueil. Je n'oublierai jamais comme elle savait éveiller l'intérêt de son auditoire pour la Pharmacodynamie et la bienveillance qu'elle m'a toujours personnellement témoignée. Elle a accepté très spontanément de siéger dans mon Jury de thèse et de s'intéresser à mon travail.

Lorsque le Conseil de la Faculté m'a désigné comme assistant puis comme délégué-Chef de travaux pratiques, Monsieur le Professeur BLOCH et Monsieur ANZIANI m'ont accueilli très cordialement et ne m'ont pas ménagé leurs encouragements et leurs conseils. C'est grâce à leur sollicitude qu'il m'a été

possible d'assurer un enseignement d'analyse qualitative et quantitative. Je les assure de tout mon dévouement et les remercie de tout cœur pour les multiples conseils qu'ils n'ont cessé de me prodiguer.

J'exprime aussi toute ma gratitude au Pharmacien-Capitaine Claude JARDIN, mon prédécesseur au laboratoire de Matière Médicale qui a bien voulu, avec une grande patience, m'initier à ses activités dans la production des médicaments antilépreux. Son expérience acquise au cours de deux séjours consécutifs à l'Institut Marchoux de Bamako m'a été très précieuse. De conversations avec le Pharmacien-Commandant P. RIVOALEN, des Troupes Coloniales, actuellement Directeur de Recherches aux Laboratoires Roger BELLON, spécialiste des thérapeutiques antilépreuses, j'ai pu retirer de bien utiles indications. Cl. JARDIN et P. RIVOALEN ont été l'un et l'autre pour moi comme un "lien spirituel" entre mon travail de laboratoire et sa destination finale, qui est de contribuer à soulager la souffrance des lépreux.

C'est grâce à l'amabilité de l'Inspection des Eaux et Forêts du Cameroun, du Gabon, et de la Côte d'Ivoire et notamment de Messieurs les Inspecteurs CATTINOT, BARBAUD, RABOURDIN et LETOUZEY, que le Laboratoire de Matière Médicale a pu obtenir les matières premières étudiées au cours de ce travail. Je tiens à leur affirmer ma sincère gratitude sachant combien est lourde leur tâche quotidienne et combien leur travail de prospection représente de difficultés et de fatigues.

Devant la confusion de nomenclature qui est apparue à la lecture des publications concernant certaines espèces, il était indispensable de vérifier l'identité de nos échantillons et de leur appliquer une désignation correcte. C'est à l'amicale assistance et à la grande compétence de Monsieur le Professeur AUBREVILLE et de Monsieur PELLEGRIN du laboratoire de Phanérogamie du Muséum d'Histoire Naturelle que nous pouvons affirmer l'identité de nos échantillons et les nommer correctement.

Enfin, j'en aurai garde d'oublier les Etablissements SPECIA et THERAPLIX qui ont gracieusement mis à ma disposition de nombreux documents. Mes vifs remerciements leurs sont acquis.

J'interromprai avec regret mon travail et ma présence à ce laboratoire de Matière Médicale, dont l'atmosphère de franche camaraderie est si favorable au travail. Comment ne pas évoquer ici Suzanne HEINRICH, ma camarade d'études et de laboratoire avec laquelle le travail en pleine communauté intellectuelle était si profitable. Tous nos soucis étaient partagés et nos efforts mis en commun. Je tiens à lui redire toute mon amitié et à la remercier de la patience et du dévouement dont elle a si souvent fait preuve à mon égard. Notre étroite collaboration, qui je l'espère se poursuivra, représente pour moi un de mes meilleurs souvenirs de ces trois années de travail.

J'ai eu bien souvent recours à l'inlassable complaisance de Mlle Y. ERHART dont le concours ne m'a jamais fait défaut. M. Paul BIEGEL n'a mesuré ni son temps, ni ses efforts pour m'éviter bien des tâches matérielles toujours fastidieuses. J'adresse à ces deux collaborateurs permanents du laboratoire, l'assurance de toute mon amitié et de mes remerciements très sincères. Je conserverai aussi le meilleur souvenir de mes camarades, Louise CHAIS, Andrée HEYER, Frosa PAZARINCEVIC, Humberto ORTIZ AMIEL, dont la présence au laboratoire contribuait à rendre l'atmosphère sympathique et agréable.

INTRODUCTION

LES HUILES DE CHALMOOGRA ET LE TRAITEMENT DE LA LÈPRE

Malgré les progrès récents de la thérapeutique et les efforts déployés pour lutter contre les endémies tropicales, la lèpre reste un des fléaux des pays chauds. Il est bien entendu difficile de déterminer, même approximativement, le nombre total des lépreux dans le monde. Tout au plus peut-on dire que le nombre de malades connus et soignés est en continuelle progression ; il n'y a d'ailleurs pas lieu de tirer de cette constatation des conclusions pessimistes ou d'en déduire une extension de la maladie ; bien au contraire, grâce aux moyens mis en œuvre pour dépister les lépreux, un nombre de plus en plus grand d'entre eux accède aux soins médicaux. En 1952, un essai de recensement des lépreux dans le monde, effectué par J. P. VELTEN [120] donnait un chiffre de 4 328 000. R. FOLLEREAU, de son côté, estime ce chiffre à 10 000 000. Plus récemment une étude de l'Office Mondial de la Santé, publiée dans le Courrier de l'Unesco [23], confirmait ce chiffre et l'auteur poursuivait "le nombre de cas de lèpre dans le monde n'a jamais été aussi élevé (10 à 12 millions) parce que ceux qui en souffraient en secret sortent chaque jour plus nombreux de leur isolement pour se faire soigner". C'est ainsi que dans la seule Afrique Occidentale Française, l'Institut Marchoux de Bamako dénombrait, au 31 décembre 1952, plus de 250 000 lépreux.

Mais dans la lutte contre la lèpre, de très grands succès ont été obtenus durant les dernières décades. Si le courageux combat mené par le Dr. SCHWEITZER, dans son Institut de Lambaréné, ou les récents écrits de Raoul FOLLEREAU, ont éveillé, par la publicité considérable qui leur a été faite, l'attention du grand public sur la lèpre et son traitement, il faut citer en tout premier lieu les silencieux efforts déployés par le Service Général d'Hygiène Mobile et de Prophylaxie (S. G. H. M. P) dans les territoires africains qui constituent, aujourd'hui, la Communauté. L'Institut Marchoux de Bamako, en particulier, -Organisme Fédéral rattaché à ce service et à la Direction Générale de la Santé Publique à Dakar-, est le poste de commandement où s'élabore la stratégie de la lutte contre la lèpre dans toute l'Afrique Occidentale.

Expérimentant à la fois les médicaments nouveaux dus aux progrès de la chimiothérapie (en particulier les sulfones) et les médicaments traditionnels déjà utilisés dans l'antiquité sous le nom d'"huile de chaulmoogra", chimistes et médecins ne cessent d'élargir l'arsenal thérapeutique utilisé dans la lutte contre la terrible maladie. D'ores et déjà, de magnifiques résultats ont été obtenus. Les temps sont heureusement révolus où le lépreux, après que l'on ait célébré pour lui l'office des morts, se voyait conduit dans une "ladrerie" où il perdait tout de sa condition humaine y compris la personnalité juridique, de sorte que ses biens cessaient de lui appartenir et qu'il devait se résoudre à vivre d'aumô-

nes. CLAUDEL a puissamment rendu dans "L'Annonce faite à Marie", cette atmosphère d'angoisse que causait alors la présence de la redoutable maladie. A ce propos, on lira avec le plus grand intérêt dans l'excellent historique du Professeur J. COTTET [32] l'évolution des conceptions que les peuples se firent de la lèpre tout au long des siècles.

La lèpre n'est plus, cependant, aujourd'hui cette maladie à l'issue presque toujours fatale faisant du malade un véritable paria de la Société. Et aux sévères prescriptions bibliques [14] des époques lointaines où seul le miracle [15] pouvait vaincre le fléau, ont fait place, aujourd'hui, des centres de traitement modernes, où le malade retrouve la force de vivre parce qu'il a maintenant l'espoir de guérir.

Les sulfones et les huiles de chaulmoogra constituent les médicaments les plus fréquemment utilisés; souvent d'ailleurs on associe les deux traitements car l'on considère leur action spécifique comme synergique. Les huiles de chaulmoogra constituent un des rares médicaments d'origine végétale qui ait résisté au déferlement des produits nouveaux que la chimie synthétique met de nos jours à la disposition du thérapeute. Bien que certains aient prédit leur disparition après que les sulfones eurent révélé leur indéfinissable efficacité, les médicaments chaulmoogriques continuent à être très largement utilisés. C'est ainsi que par exemple, selon le rapport du Pharmacien-Capitaine Cl. JARDIN [57], près de 18 tonnes d'huiles antilépreuses ont été employées par l'Institut Marchoux de Bamako pour la seule année 1953. C'est dire à quel point ce très vieux médicament reste d'actualité.

Jusqu'au début de ce siècle, l'origine des "huiles de chaulmoogra" était fort douteuse. Ces huiles étaient préparées avec des graines achetées sur les marchés en provenance de différentes régions des Indes. On ignorait d'ailleurs l'espèce productrice, si bien qu'il était impossible d'assurer le contrôle technique de la matière première et, par conséquent, les qualités thérapeutiques du produit. DESPREZ [37] dans sa thèse ⁽¹⁾, montra le premier que la plante productrice n'était pas, comme on le croyait le Gynocardia odorata, mais un arbre voisin appartenant, lui aussi, à la famille des Flacourtiacées qu'il dénomma Gynocardia Prainii en hommage à Sir David PRAIN, Directeur du Jardin de Sibpur (Calcutta) qui lui avait adressé divers échantillons botaniques de ces espèces. Celui-ci, mis en éveil par les observations de DESPREZ, ne tarda pas à découvrir la véritable origine de la plante productrice qu'il identifia au Taraktogenos Kurzii (KING), de la jungle birmane [103]. L'origine botanique des graines de chaulmoogra était ainsi bien établie, mais la constitution chimique de l'huile restait encore confuse, de sorte que l'on ne possédait aucun moyen d'identification précis du médicament. Quelques années plus tard, POWER et ses élèves [100, 101, 102] élucidaient la constitution chimique des acides gras des huiles de chaulmoogra, découverte qui marquait un énorme progrès dans la connaissance de cette drogue.

Néanmoins, si du point de vue scientifique, la question était pleinement résolue, en pratique les marchés d'Europe et même d'Amérique continuèrent à recevoir durant de longues années sous le nom d'"huile de chaulmoogra", des huiles expédiées par les courtiers de l'Inde, dont les caractères chimiques et les propriétés thérapeutiques étaient fort variables. Ainsi selon V. LABERNADIE et N. LAFFITTE [68], des huiles de Jatropha Curcas (LINNE) auraient été expédiées sous le nom de "chaulmoogra" aux acheteurs européens ainsi que d'autres huiles d'origine botanique éloignée de celle des huiles antilépreuses et d'identification très incertaine. Aussi, devant la difficulté de contrôler la matière première, le Ministère de l'Agriculture des U. S. A. envoya en 1921, F. J. ROCK aux Indes afin d'étudier et de se procurer les graines de Taraktogenos Kurzii. Celui-ci, au cours d'une mission particulièrement mouvementée, acquit très vite la

(1) On trouvera dans cet ouvrage toute la bibliographie antérieure à 1900.

conviction que "les fabricants des huiles de chaulmoogra ne connaissaient rien de l'espèce productrice" [109]. Il réussit, cependant, à découvrir dans les forêts birmanes, les premiers groupements forestiers de ces arbres dont il envoya les semences, en vue de leur culture expérimentale, aux Etats-Unis et aux Iles Hawaï. Enfin, en 1924, le Professeur MUIR [82] à Calcutta même, déclarait qu'il avait renoncé à se procurer des graines de Taraktogenos Kurzii pour le traitement de ses lépreux, tellement la chose était difficile. Cette espèce pousse, en effet, en pleine forêt birmane, dont l'accès est rendu malaisé par l'exubérance de la végétation et l'abondance des tigres. Aussi utilisa-t-on bientôt des espèces voisines, appartenant également à la famille des Flacourtiacées, et dont les graines fournissent des huiles de constitution comparable à celle du chaulmoogra. De sorte que, parlant du chaulmoogra, on a glissé par la force des choses, du Taraktogenos - très rare- à l'Hydnocarpus, beaucoup plus commun, puis à toutes les espèces capables de fournir des huiles antilépreuses.

En 1926, Emile PERROT recensait déjà 15 espèces susceptibles de fournir des huiles de chaulmoogra [94] et en donnait les caractères botaniques ainsi que de nombreuses photographies. La plupart des espèces étudiées appartiennent au genre Hydnocarpus dont il signale dix espèces oléagineuses et thérapeutiquement actives, l'aire de dispersion de ce genre étant beaucoup plus vaste que celle des Taraktogenos. Le représentant le plus connu du genre est certainement Hydnocarpus Wightiana (BLUME) que le Pharmacien-Colonel N. LAFFITTE a introduit à Pondichéry alors qu'il ne croissait spontanément que sur la côte de Malabar (Indes Occidentales). Une fabrication artisanale fut rapidement créée par les officiers du Corps du Service de Santé des Troupes Coloniales et leurs efforts furent assez fructueux pour établir une production suffisante pour approvisionner les services officiels de tous les Territoires de la France d'Outre-Mer et même pour céder à l'industrie française, plusieurs tonnes d'huile chaque année. La production d'huile augmenta d'ailleurs très rapidement grâce à la persévérance des différents chefs de service qui se sont succédés, les Pharmaciens-Capitaines N. LAFFITTE, A. CHEVALIER, M. E. BOUILLAT, N. MONGLOND. De son côté, l'Institut Pasteur de Saïgon fabrique à partir d'Hydnocarpus anthelmintica (PIERRE) ou "Krabao" les huiles de chaulmoogra nécessaires au traitement des malades de l'Indochine [96], l'emploi de ces graines ayant été préconisé dès 1926 par M. ALEXIS et B. MENAUT [5]. Ainsi se trouve mis en évidence le rôle important qu'ont joué les pharmaciens français dans les recherches concernant les huiles de chaulmoogra, recherches que dirigea avec sa grande compétence, l'éminent Professeur E. PERROT qui fut un des pionniers en ce domaine.

Cette énumération, cependant, ne serait pas complète si nous ne mentionnions pas les principaux auteurs étrangers qui participèrent aux recherches sur les espèces capables de fournir des huiles de chaulmoogra - ROCK [109] étudia Hydnocarpus Castanea et Hydnocarpus Curtisii - WOLFF et KOLDEWIJN [125], l'Hydnocarpus alpina des Indes Néerlandaises - KIRTIKAR et BASU [64], l'Hydnocarpus Wightiana de la côte de Malabar - GEORGI, BUCKLEY et GUNN LAY TEIK [44] les Hydnocarpus de Malaisie - PERKINS et CRUZ [93], l'Hydnocarpus Alcala et l'Hydnocarpus subfalcata des Philippines, l'Hydnocarpus Woodii et l'Hydnocarpus Hutchinsonii de Bornéo, l'Hydnocarpus venenata, enfin, des Indes et de Ceylan - BEDDOME [12], l'Asteriastigma macrocarpa, etc.

Toutes ces espèces sont originaires d'Asie et ont fourni jusqu'à une période récente, la presque totalité des huiles de chaulmoogra utilisées. Pour l'Afrique, les études ont été abordées plus récemment. Elles furent surtout consacrées au Gorli et elles ont été poursuivies - pour la plupart - sous l'autorité du Professeur E. PERROT. Cependant, les événements politiques de l'après-guerre qui ont mis en question la présence française dans le Sud-est asiatique ont quelque peu compromis l'approvisionnement en huile de chaulmoogra. L'attention a donc été, de nouveau, attirée par les espèces d'origine africaine ou acclimatées en Afrique et qui donnent des huiles similaires aux huiles de chaulmoogra. Dans son rapport de mission en A. O. F., Mlle M. -Th. FRANCOIS [41] indique que,

déjà en 1952, l'Institut Marchoux de Bamako fit récolter trois tonnes de graines de Gorli qui ont fourni 1 125 kgs de beurre de Gorli, dont la constitution chimique et les propriétés thérapeutiques sont très voisines de celles des huiles asiatiques.

C'est précisément au moment où se développe l'utilisation des espèces africaines que nous en reprenons l'étude, afin de déterminer celles qui sont susceptibles de fournir les huiles les plus actives. Mais quelle que soit la nature des lipides d'une graine oléagineuse, la méthode utilisée pour l'extraction doit encore permettre d'obtenir, avec un rendement convenable, une huile répondant à un certain nombre de caractères. Nous avons donc recherché les moyens les plus propices à préparer les huiles de chaulmoogra et leurs esters éthyliques qui en sont la forme d'utilisation la plus courante. Enfin, pour permettre la poursuite de l'exploration clinique des propriétés thérapeutiques de certains constituants des huiles de chaulmoogra, et en particulier, de l'acide gorlique qui se trouve en faible quantité dans les différentes espèces et qui, selon les observations inédites du Médecin-Colonel LAVIRON (1) -qui fut directeur de l'Institut Marchoux pendant dix sept ans- aurait comme nous le verrons une activité antilépreuse beaucoup plus marquée que celle des autres acides gras, nous avons recherché une méthode permettant l'extraction rapide de quantités importantes d'acide gorlique, dans un état de pureté aussi poussé que possible. Les principales parties de ce travail sont donc les suivantes :

- Détermination des espèces dont les glycérides ont une constitution chimique particulièrement propice à l'usage médical.

- Détermination d'une méthode de fabrication des huiles et de leurs esters éthyliques, qui puisse être appliquée dans des conditions industrielles aussi favorables que possible.

- Recherche d'une méthode capable de fournir facilement de l'acide gorlique pratiquement pur, aux fins d'expérimentation clinique ultérieure, et en vue d'une éventuelle introduction de ce médicament dans la thérapeutique antilépreuse.

(1) Communication personnelle

PREMIÈRE PARTIE

CARACTÈRES DES HUILES DE CHAULMOOGRA ET DE LEURS DÉRIVÉS DESTINÉS A L'USAGE OFFICINAL

A - LES HUILES DE CHAULMOOGRA DANS LES PHARMACOPEES

Les modes d'administration des médicaments chaulmoogriques sont extrêmement variés. Cependant, une évolution se dessine au profit de leur utilisation par la voie parentérale, l'administration "per os" ou par application locale étant de plus en plus délaissée. Mais quel que soit son mode d'utilisation, le médicament doit répondre aux exigences des Pharmacopées.

L'origine du produit ainsi que les caractères exigés varient quelque peu selon les formulaires officiels. Les définitions données s'accordent cependant assez bien entre elles et les caractères analytiques sont, pour la plupart, suffisamment rapprochés. Selon que les huiles proviennent d'une ou de plusieurs espèces, les exigences seront évidemment plus ou moins larges. Certaines pharmacopées n'admettent que les huiles produites à partir de graines d'une seule espèce : la Pharmacopée britannique exige par exemple, une huile de Hydnocarpus Wightiana ; la Pharmacopée hollandaise, une huile de Taraktogenos Kurzii. Mais le plus fréquemment on admet les huiles de différentes espèces de Taraktogenos et de Hydnocarpus à la condition, toutefois, qu'elles répondent aux caractères analytiques exigés. C'est le cas du Codex français qui, sur ce point, est en parfait accord avec la Pharmacopée internationale. On peut, cependant, regretter que les huiles de Flacourtiacées africaines - qui, pourtant, sont couramment utilisées et dont les caractères répondent généralement aux exigences des différentes Pharmacopées - ne figurent nommément dans aucune d'entre elles. La Pharmacopée française donne, en effet, de l'huile de chaulmoogra, la définition très générale suivante : "huile obtenue par expression des graines fraîches et mûres de certains arbres appartenant à la famille des Flacourtiacées et, notamment, de divers Hydnocarpus : Hydnocarpus Wightiana (Blume) Hydnocarpus anthelmintica (Pierre) Hydnocarpus heterophylla (Blume) et aussi de Taraktogenos Kurzii (King)".

Certaines divergences, cependant, subsistent notamment en ce qui concerne l'acidité de l'huile. Les différentes pharmacopées tolèrent généralement - et à tort semble-t-il - des indices d'acide fort élevés. Ainsi, la Pharmacopée helvétique tolère un indice d'acide compris entre 38 et 45, valeurs très supérieures aux indices d'acide des huiles de chaulmoogra courantes. En outre, fixer à l'indice d'acide une valeur minimum de 38 est totalement dénué de sens puisque tous les auteurs s'accordent pour admettre que l'emploi d'huiles trop acides rend les injections douloureuses et peut être à l'origine de réactions secondaires désagréables. M. PERROT et Mlle M. -Th. FRANCOIS [97] indiquaient dès 1935, la liste des caractères à exiger d'huiles dites de "chaulmoogra" en souhaitant qu'une entente internationale se fit à leur propos. Ils précisaient notamment "que la limite inférieure de l'indice d'acide n'a aucune signification spécifique et qu'il conviendrait d'adopter la limite supérieure de 7 % (exprimée en acide oléique)

- soit un indice d'acide de 15 environ - chiffre moyen proposé par la majorité des pharmacopées, et maximum admis par la pharmacopée japonaise et la Commission française du Codex". La Pharmacopée internationale, en fixant l'indice d'acide maximum à 6 pour les huiles utilisées en injections, et à 10 pour les huiles destinées à l'usage externe, se trouve d'ailleurs en parfait accord avec les auteurs cités.

Pour identifier à coup sûr les huiles du groupe chaulmoogrique, un seul caractère est spécifique : c'est le pouvoir rotatoire dextrogyre élevé. Toutes les Pharmacopées s'accordent sur ce point et exigent une déviation polarimétrique minimum de $+50^{\circ}$ à la température de 25° , en opérant sur une solution chloroformique à 10 %. La Pharmacopée internationale exige que cette valeur soit comprise entre 49° et 57° , bien que, dans l'état actuel de nos connaissances, il n'y a aucune raison pour fixer ici une limite supérieure.

Enfin les limites admises pour l'indice d'iode sont généralement assez larges : 85 à 105 pour le Codex français, 89 à 108 pour la Pharmacopée internationale. Notons que ces limites correspondent à la définition très large des huiles de chaulmoogra donnée par ces pharmacopées et qui englobe la plupart des espèces contenant des acides cyclopenténiques optiquement actifs. Nous verrons, ci-dessous, que la plupart des espèces africaines présente un indice d'iode compris dans ces limites. La Pharmacopée du Royaume-Uni, par contre, est beaucoup plus stricte : elle exige que les valeurs de l'indice d'iode soient comprises entre 97 et 103, valeurs qui correspondent d'ailleurs à l'huile d'Hydnocarpus Wightiana, seule officinale en Angleterre.

Les autres caractères couramment exigés ont moins retenu notre attention car ils ne permettent pas de tirer des renseignements significatifs quant à la constitution chimique de l'huile et donc, à sa valeur thérapeutique. Dans l'étude comparative des huiles des différentes espèces africaines, dont nous disposons, nous avons négligé la détermination de ces caractères sans grand intérêt, tel l'indice de saponification qui oscille entre 185 et 210 - correspondant toujours à des acides gras en C 16 et C 18 -, l'indice de réfraction, la densité, etc.

En fait, il faudrait rechercher, outre les caractères chimiques exigés par les pharmacopées, des huiles présentant également un certain nombre de qualités économiques, telles, par exemple, pour chaque espèce, que sa fréquence, son aire de dispersion géographique, la facilité de la récolte, la dimension des graines et surtout leur rendement en huile.

Ce rendement semble, en effet, caractéristique de chaque espèce. Aussi donnera-t-on toujours la préférence, pour les huiles de composition analogue, aux espèces dont les rendements sont les plus élevés. Mais ce rendement varie selon le mode de préparation (pression ou extraction) et, dans ce dernier, cas avec le solvant employé : ainsi les graines épuisées par l'éthanol bouillant, fournissent un rendement en huile utilisable moins élevé que lorsque l'épuisement est opéré au moyen de l'éther de pétrole.

B - LA CONSTITUTION CHIMIQUE DES HUILES DE CHAULMOOGRA

Les huiles de chaulmoogra ont tout spécialement retenu l'attention des chimistes par la nature très particulière des acides gras qui les constituent. Ce sont, en effet, les seules huiles végétales à contenir des acides cycliques que l'on ne retrouve nulle part ailleurs dans la nature, et dont la molécule renferme un cycle penténique sur lequel vient se greffer une longue chaîne latérale linéaire. Nous indiquons ci-contre les formules développées des 7 acides cyclopenténiques dont la présence a pu être mise en évidence dans les huiles de chaulmoogra. Parmi ceux-ci 3 seulement se retrouvent en proportions relativement élevées dans les huiles naturelles, ce sont :

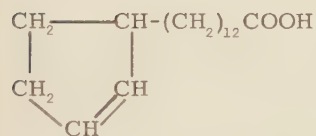
- l'acide chaulmoogrique, qui est le constituant essentiel des huiles originaires des espèces africaines. Celles-ci en contiennent toujours une proportion variant de 60 à 80 % environ.

- l'acide hydnocarpique, qui est au contraire très abondant dans les huiles originaires des espèces asiatiques, en particulier les huiles d'"Hydnocarpus" dont il tient son nom. Par contre, les huiles des principales espèces africaines en sont dépourvues, à l'exception toutefois de celles qui proviennent du genre Lindackeria.

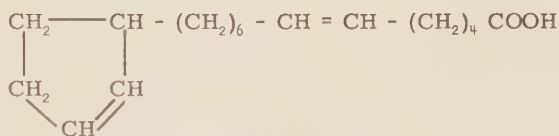
- l'acide gorlique est beaucoup moins abondant : les huiles antilépreuses, quelle que soit leur origine, n'en contiennent jamais plus de 20 % et le taux moyen varie entre 8 et 15 %. C'est le seul acide cyclopenténique à posséder deux liaisons éthyléniques.

Quant aux 4 autres acides gras, ils n'existent qu'à l'état de traces et ont été mis en évidence par COLE et CARDOSO [28] dans l'huile d' Hydnocarpus Wightiana. S'ils sont intéressants du point de vue théorique, ils ne présentent par contre qu'un intérêt pratique très limité.

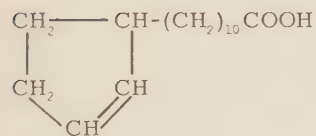
LES ACIDES CYCLOPENTENIQUES DES HUILES DE CHAULMOOGRA



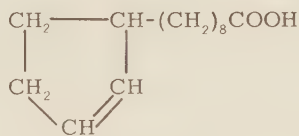
Acide chaulmoogrique



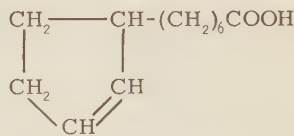
Acide Gorlique



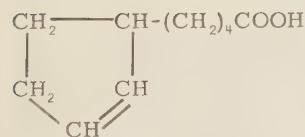
Acide Hydnocarpique



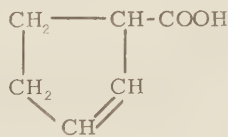
Acide aléprique



Acide Aléprylique



Acide aléprestique



Acide aléprolyque

Tous ces acides gras en raison de la configuration spatiale de leur molécule sont doués du pouvoir rotatoire, ce qui permet de les caractériser très facilement, ainsi que les huiles dont ils sont les constituants. Les huiles antilépreuses contiennent également mais à des taux variables et généralement beau-

coup plus faibles, des acides gras linéaires classiques et notamment les acides palmitique (acide saturé en C 16) et oléique (acide monoéthylénique en C 18). Ces deux acides gras sont dépourvus du pouvoir rotatoire et se distinguent donc très facilement des acides cyclopenténiques.

Le tableau n° 1 indique les principales caractéristiques des 4 acides gras que l'on retrouve dans la plupart des huiles africaines et dont nous aurons l'occasion de reparler tout au long de ce travail.

Tableau n° 1

Caractères des acides gras des "huiles de chaulmoogra" Africaines.

	Poids moléculaire	Etat Physique	Indice d'Iode	Déviati on polarimétrique
Acide chaulmoogrique	280	solide	90, 5	60°,30 [31]
Acide gorlique	278	liquide	182, 5	60°,70 [28]
Acide palmitique	246	solide	0	0
Acide oléique	282	liquide	90, 1	0

C - LE SIEGE DE L'ACTIVITE THERAPEUTIQUE

Bien que ce problème ait jadis donné lieu à de multiples controverses, la majorité des auteurs sont maintenant d'accord pour attribuer l'activité thérapeutique des huiles antilépreuses aux acides cyclopenténiques qu'elles contiennent. La thèse selon laquelle les matières insaponifiables seraient également douées d'une activité antilépreuse tend aujourd'hui à être abandonnée, car les résultats obtenus lors de l'expérimentation chimique sont toujours restés négatifs, comme nous l'indiquons ci-dessous (page 50). Quant aux acides gras linéaires (oléique et palmitique), ils sont bien entendu dépourvus de toute activité et doivent en quelque sorte être considérés comme une impureté du médicament. Il y aura donc toujours lieu de donner la préférence aux huiles qui en contiennent les proportions les plus faibles : cet objectif restera d'ailleurs au cours de notre travail, une de nos constantes préoccupations.

Il reste maintenant à savoir si l'activité thérapeutique de l'acide chaulmoogrique et de l'acide gorlique est identique ou si l'un possède une activité thérapeutique spécifique supérieure à l'autre. En ce domaine, seule l'expérimentation directe, effectuée sur les lépreux, peut nous fournir quelques renseignements. Encore convient-il ici d'avancer prudemment, car il est toujours difficile de tirer des renseignements définitifs de tels essais thérapeutiques. Les appréciations du malade sont, en effet, plus ou moins subjectives, cependant que le clinicien peut, lui aussi, être influencé plus ou moins consciemment par l'idée qu'il se fait de l'action thérapeutique du médicament qu'il expérimente. En ce domaine délicat, intervient donc toujours un fort coefficient de subjectivité, et il faut se garder de considérer comme ayant une valeur absolue, des résultats soi-disant concluants qui n'aient été maintes fois reproduits. Ceci est tellement vrai qu'il existe aujourd'hui encore des léprologues qui ne croient pas "aux vertus" du Chaulmoogra, alors que d'autres critiquent sévèrement l'irruption des sulfones dans la thérapeutique antilépreuse. La prudence aussi est de rigueur

lorsque l'on prend en considération les résultats des essais effectués in vitro sur des bacilles acido-résistants, ou in vivo, dans la tuberculose animale ou la lèpre du rat par exemple. En effet, les résultats sont très discordants, selon les auteurs et les méthodes utilisées, et très souvent, ils ne sont pas reproductibles, quand on passe à l'expérimentation directe sur le malade.

Toutes ces restrictions étant faites, il est cependant raisonnable de penser que l'acide gorlique est doué d'une activité particulière et il n'est pas inutile, croyons-nous, d'exposer brièvement ici les travaux et les arguments qui nous permettent aujourd'hui d'aboutir à cette conclusion.

C'est tout d'abord au nombre de liaisons éthyléniques présentes dans leur molécule que l'on a attribué l'augmentation de l'activité thérapeutique constatée chez les médicaments riches en doubles liaisons. Le Docteur Salvador GIL QUINZA [47] écrivait dans une longue étude consacrée à l'huile de Chaulmoogra: "si l'on considère la série de toutes les préparations à base d'huile de Chaulmoogra, on peut observer chez les chercheurs une tendance à augmenter le caractère de non-saturation de la molécule chaulmoogrique, comme si l'efficacité thérapeutique résidait dans le fait de cette non-saturation". Et de fait, les nombreux chimistes qui s'employèrent à transformer la molécule des acides cyclopenténiques en vue d'en augmenter l'activité thérapeutique s'efforcèrent-ils d'augmenter le degré de non-saturation. BURSCHKIES [21], après avoir transformé l'ester éthylique de l'acide chaulmoogrique en alcool chaulmoogrylique par la méthode de BOUVEAULT et BLANC combine cet alcool avec différents acides gras saturés et non-saturés : une étude systématique sur la tuberculose expérimentale du Cobaye et la lèpre du rat est entreprise avec les composés synthétiques obtenus, au terme de laquelle l'auteur conclue que l'activité de ces esters est d'autant plus grande qu'ils sont moins saturés. De plus, ces esters non saturés étaient liquides, et pouvaient, de ce fait, être facilement utilisés en injections. De son côté, SCHOLB obtenait des résultats identiques, et parvenait aux mêmes conclusions.

Situés dans ce contexte, les travaux de BUU HOI et de ses collaborateurs [22, 23, 24] semblent à priori, bien insolites : ces auteurs en effet ont soumis les acides cyclopenténiques à l'hydrogénation catalytique, obtenant ainsi les acides dihydrochaulmoogrique et dihydrohydnocarpique, composés saturés qui se révélèrent à l'expérience moins toxiques ; en outre, ils attribuent à la double liaison "des symptômes d'intolérance de base, caractérisée par une altération corticosurrénalienne, qui disparaissent par saturation de la molécule". Encouragés par ces résultats, ces auteurs étudièrent de nombreux dérivés des acides cyclopenténiques, ou la double liaison est saturée par l'hydrogène, les hydracides, l'iode, etc. Ces composés saturés, et en particulier l'huile de Chaulmoogra hydrogénée, furent ensuite introduits dans l'arsenal thérapeutique, et employés avec succès, notamment par J. GATE et J. ROUSSET [42], qui considèrent ce produit comme la meilleure forme d'utilisation de l'huile de Chaulmoogra.

En fait, cette contradiction n'est qu'apparente : elle ne résiste pas à une étude bibliographique serrée de la question. Tout d'abord BUU-HOI ne conteste pas l'activité thérapeutique des médicaments chaulmoogriques classiques, pas plus d'ailleurs que GATE et ROUSSET. Mais il met en évidence la diminution de la toxicité, cependant que GATE et ROUSSET soulignent "l'extrême facilité de son application... et la possibilité de poursuivre très régulièrement le traitement en raison précisément de ses qualités qui la rendent indolore". Or, cette toxicité, BUU-HOI le constate lui-même, n'est pas attribuée à la présence des liaisons éthyléniques, mais bien plutôt au fait que ces doubles liaisons entraînent une oxydation plus rapide des produits, les préparations chaulmoogriques ne devenant irritantes que si elles sont oxydées. STEVENEL [118] a montré que l'huile est d'autant plus toxique pour la grenouille qu'elle est plus "sale et plus ancienne"; les huiles limpides et peu colorées au contraire ne sont pas toxiques. C'est donc pour diminuer les chances d'oxydation des huiles, et par conséquent

leur éventuelle toxicité, que BUU-HOI a proposé l'hydrogénation catalytique des doubles liaisons. Il est très vraisemblable que les huiles hydrogénées conservent encore une activité thérapeutique importante, car c'est sans aucun doute l'ensemble de l'édifice moléculaire cyclopenténique qui participe à l'activité thérapeutique. Mais il n'y a aucune raison de soumettre à l'hydrogénation catalytique des huiles limpides, fraîchement et correctement préparées, et dépourvues de produits d'oxydation. Or les huiles extraites par l'éthanol répondent précisément à ces conditions, et sont notamment très pauvres en produits d'oxydation ; ces dérivés oxydés, en raison des "groupements-oxhydriles" apparus dans leur molécule, sont très solubles dans l'éthanol, restent donc dissous en phase alcoolique et ne souillent pas les glycérides précipités. Ces huiles sont alors dépourvues de toxicité, mais possèdent une activité thérapeutique élevée.

Car il ne fait pas de doute que les liaisons éthyléniques si elles augmentent les possibilités d'oxydation, augmentent aussi l'activité antilépreuse. HASSELTINE [54] conclut heureusement ce débat lorsqu'il écrit : "l'ester éthylique de l'acide dihydrochaulmoogrique ne semble pas donner d'aussi bons résultats que les esters éthyliques normaux, bien qu'il cause moins d'irritations locales, et de ce fait, peut être utilisé chez des malades présentant avec les esters éthyliques des réactions locales importantes. Il est plus difficile à préparer, et son prix de revient est plus élevé. Pour ces raisons, il ne peut pas remplacer les esters éthyliques classiques pour le traitement habituel de la lèpre". Ainsi la disparition de la double liaison, si elle diminue les effets toxiques, paraît diminuer aussi l'activité thérapeutique.

L'ensemble de ces considérations, et sa longue expérience au service des lépreux ont permis au Médecin-Colonel LAVIRON d'affirmer que l'acide gorlique, possédant deux liaisons éthyléniques doit posséder, s'il est correctement préparé et conservé à l'abri de l'oxygène de l'air, une activité thérapeutique très élevée. L'acide gorlique pur ou ses dérivés n'ont pu être encore expérimentés en raison de la difficulté de leur préparation. La seule indication que l'on possède à ce sujet est due à J. TISSEUIL et P. RIVOALEN [119]. Ces auteurs ont étudié l'activité, après injections au sein des taches tuberculoïdes des malades, des glycérides liquides du beurre de Gorli (ceux-ci sont plus riches en acide gorlique que les glycérides solides essentiellement constitués par de l'acide chaulmoogrique). Ils concluent : "les glycérides liquides agissent rapidement, beaucoup plus vite que le beurre de Gorli, ou l'huile de Chaulmoogra". L'autorité de ces auteurs (J. TISSEUIL a dirigé l'Institut Marchoux avant le Colonel LAVIRON ; P. RIVOALEN a longuement séjourné à l'Institut de la lèpre), et leurs témoignages concordants, donne donc une valeur toute particulière à l'hypothèse qui ferait de l'acide gorlique un médicament de premier choix. C'est pourquoi une partie importante de notre travail est consacrée à la recherche d'une méthode de préparation de ce médicament.

D - DETERMINATION DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE ET DE L'ACTIVITE THERAPEUTIQUE DES HUILES ANTILEPREUSES

Connaissant d'une part la nature des acides gras qui contiennent les huiles de chaulmoogra et d'autre part, l'activité thérapeutique de chacun d'entre eux, il est maintenant nécessaire de rechercher des méthodes analytiques susceptibles de fournir d'utiles renseignements sur la teneur des huiles en ces différents acides gras et par là même sur leur activité thérapeutique. A cet égard, l'indice d'acide, l'indice d'iode, la déviation polarimétrique et d'un point de vue plus général les différents caractères dont la détermination est exigée par la pharmacopée, nous fourniront de précieuses indications.

L'indice d'acide indique la quantité d'acides gras libres contenus dans les huiles. Il est d'autant plus élevé que les huiles sont plus anciennes ou moins soigneusement préparées et donne, par conséquent, une indication précieuse

sur leur degré d'altération. Mais sa détermination revêt une importance toute particulière lorsque les huiles sont destinées à être administrées par la voie parentérale. Selon MM. BEAUDIMENT et RIVOALEN [8], les huiles de chaulmoogra ne peuvent être utilisées qu'après une neutralisation qui ramène le taux d'acidité - exprimé en acide oléique - à moins de 6 % pour la voie digestive, à moins de 3 % pour la voie intramusculaire, à moins de 0,8 % enfin pour la voie intraveineuse. De son côté, le Général PLUCHON [98] indique qu'au-dessus d'une acidité oléique de 3,5 à 4 %, l'huile de chaulmoogra est mal supportée et il préconise un procédé de neutralisation qui permette de ramener cette acidité à 2,5 %; ceci afin de perdre le minimum de produit actif. Nous avons, pour notre part, étudié un procédé de fabrication des huiles de chaulmoogra qui fournit directement et sans qu'il soit nécessaire de procéder à une neutralisation préalable, des huiles dont l'indice d'acide ne dépasse jamais 2 (soit une acidité oléique inférieure à 1 % =) et qui, par conséquent, peuvent être utilisées directement de n'importe quelle façon, y compris en injections intraveineuses.

La déviation polarimétrique apporte également des renseignements de grande valeur. En effet, comme nous l'avons vu, les acides gras cyclopenténiques, eux seuls, sont doués d'un pouvoir rotatoire droit, dont la valeur est indiquée au tableau n° 1, (page 8), cependant que les acides linéaires n'ont aucune activité sur le plan de polarisation de la lumière. Ainsi la déviation polarimétrique sera d'autant plus élevée que les glycérides seront plus riches en acides cyclopenténiques qui, seuls parmi les acides gras, ont une activité antilépreuse. A l'inverse, il s'abaissera quand la proportion des acides linéaires (palmitique et oléique), dans les glycérides, augmentera. L'activité thérapeutique est donc, au moins partiellement, proportionnelle à la valeur de la déviation polarimétrique.

L'indice d'iode permet de situer les acides éthyléniques et notamment l'acide gorlique, acide possédant deux doubles liaisons et dont l'indice d'iode théorique pour $C_{18}H_{30}O_2$ est de 182,5. De son côté, l'acide chaulmoogrique n'ayant qu'une double liaison possède un indice d'iode de 90,5 ainsi que l'acide oléique qui a la même formule brute, tandis que l'indice d'iode de l'acide palmitique est nul. Ainsi pourrions-nous très facilement déterminer la teneur en acide linéaire saturé ou en acide gorlique des lipides. Cette détermination est donc particulièrement précieuse. Ce sera même la seule méthode utilisable pour la recherche de l'acide gorlique, et sa détermination guidera notre travail lorsque nous tenterons de mettre au point une méthode qui permettra d'obtenir de l'acide gorlique en quantité suffisante pour permettre une expérimentation clinique et vérifier son activité thérapeutique.

Nous retiendrons enfin le point de fusion, dont la détermination est simple, mais à vrai dire assez peu précise pour les lipides. Les pharmacopées étrangères exigent, pour la plupart, un point de fusion inférieur à 30°, cependant que le Codex français tolère un point de fusion inférieur à 35°, ceci afin de permettre l'introduction des huiles africaines du type de l'huile dite de "Gorli". Il convient donc de rechercher des glycérides à point de fusion peu élevé qui, par conséquent, sont facilement utilisables en injections. Un point de fusion bas indique également un taux important d'acides gras liquides et, s'il s'accompagne d'un indice d'iode élevé, d'acide gorlique.

Notre travail a donc été guidé par le souci d'obtenir, dans de bonnes conditions de rendement, des huiles peu acides de bas point de fusion, dont la déviation polarimétrique et l'indice d'iode soient aussi élevés que possible, révélant ainsi une forte teneur en acides optiquement actifs et, en particulier, en acide gorlique.

Tels sont les objectifs que nous nous proposons en entreprenant ce travail et qui guideront notre recherche tout au long de cette étude.

La Commission des Matières Grasses de l'Union Internationale de Chimie pure et appliquée, (38, rue St-Dominique - Paris) s'est donnée pour tâche la normalisation des méthodes d'analyse des corps gras. Les résultats obtenus ont été publiés dans les Méthodes Unifiées Internationales et nous nous sommes toujours référé à ces méthodes. Un grand nombre de celles-ci correspondent d'ailleurs aux méthodes préconisées par la Commission des Matières Grasses de l'Association française de Normalisation (A. F. N. O. R.) (Normes Françaises, 23, rue Notre-Dame des Victoires - Paris).

Les indices d'iode ont tous été déterminés par la méthode de WIJS [75]. Les indices d'acides par la méthode internationale correspondant aux Normes françaises [72].

Les matières insaponifiables ont été extraites après saponification des glycérides, par l'éther de pétrole d'abord [73] puis par l'oxyde d'éthyle [74]. L'expérience acquise au laboratoire et les indications données par M. Emile ANDRE et Mlle MAILLE [4], au sujet de l'huile de colza, ont démontré que l'éther de pétrole est, en effet, incapable, dans bien des cas, d'extraire la totalité des matières insaponifiables. C'est pourquoi, nous avons jugé utile, après avoir épuisé la solution savonneuse par l'éther de pétrole, de poursuivre l'extraction par l'oxyde d'éthyle. Nous avons pu effectivement obtenir une petite quantité de matières extraites constituées, semble-t-il, par des xanthophylles, pigments très peu solubles dans l'éther de pétrole, et des traces de stérols, car la réaction de Lieberman est positive.

Les corps gras ne possèdent pas, en général, un point de fusion rigoureusement défini mais un "intervalle de fusion" dont l'étendue dépend des traitements qu'ils ont subi [108]. Nous avons toujours utilisé la méthode dite "du tube capillaire fermé" [84] retenant la moyenne des températures observées sur trois tubes capillaires.

La déviation polarimétrique a été déterminée par la méthode indiquée dans la Pharmacopée française, c'est-à-dire en solution chloroformique à 10%. Le Codex français ayant omis de mentionner la température à laquelle doit s'effectuer la lecture (détail de grande importance), nous nous sommes référé aux normes internationales et nous avons adopté une température de 20°. La valeur lue est ensuite ramenée à l'huile elle-même en utilisant la formule :

$$\alpha_0^{20^\circ} = \frac{\rho \cdot V}{p \cdot l}$$

p, étant le poids de l'huile contenue dans le volume ...

V, d'une solution dont la déviation polarimétrique lue dans un tube d'une longueur de 1 dm est de ρ . Cette valeur est très souvent confondue avec le pouvoir rotatoire spécifique qui tient compte de la densité déterminée à la même température et qui, par conséquent, pour les huiles, est légèrement supérieure à leur déviation polarimétrique.

DEUXIÈME PARTIE

LES FLACOURTIACÉES AFRICAINES PRODUCTRICES D'HUILES DE CHAULMOOGRA

CHAPITRE I

HISTORIQUE DE LA RECHERCHE ET DE LA PRODUCTION DES ESPÈCES CHAULMOOGRIQUES AFRICAINES

Bien avant que l'on connaisse l'origine botanique et la constitution chimique des huiles de chaulmoogra de l'Inde, les botanistes avaient signalé l'existence de différents genres africains appartenant à la famille des Flacourtiacées. Mais ces plantes n'avaient pas attiré l'attention car l'on ignorait totalement leur efficacité dans le traitement de la lèpre.

C'est à GOULDING et ACKERS [51] que revient le mérite d'avoir, dès 1913, attiré l'attention sur les huiles africaines du groupe chaulmoogrique. Ces auteurs, en effet, établirent que l'huile d' Oncoba echinata contient 87,9 % d'acide chaulmoogrique et 12,5 % d'acides liquides. La même année, l'Impérial Institute [19] publiait les caractéristiques des huiles extraites de deux échantillons de graines de "Gorli" (nom indigène d'une espèce africaine) originaires de la Sierra Leone et qui furent bientôt identifiées aux graines d' Oncoba echinata .

Quelques années plus tard, Aug. CHEVALIER [27] trouva également cette espèce en Guinée où les Africains l'employaient déjà en lotions, contre les affections de la peau. Sur la demande de M. E. PERROT, le Dr. MORISSEAU - médecin de l'Assistance indigène - assisté d'un colon, M. SCHNEIDER, retrouvèrent cette espèce en Côte-d'Ivoire et en donnèrent une description minutieuse. Les graines qu'ils récoltèrent furent analysées par M. Emile ANDRE [3] et Daniel JOUATTE [58] qui réussirent à en extraire l'acide gorlique. Cet acide diéthylénique avait déjà été isolé, quelques années plus tôt, à partir de l'huile de chaulmoogra par R. WRENSHALL et A. L. DEAN [126]. M. PERROT estimant l'huile obtenue parfaitement utilisable pour le traitement de la lèpre, confia un lot de graines à M. GROSJEAN qui en entreprit la culture à l'Ecole de Vulgarisation agricole de Soubré (Côte d'Ivoire) dès 1925. La première récolte put avoir lieu en 1929 et Mlle M.-Th. FRANCOIS [40] donna quelques mois plus tard, les caractères chimiques et physiques des huiles obtenues à partir de ces graines cultivées. Elle montra que la culture n'avait pas du tout modifié les qualités de l'huile, constatation d'une importance capitale puisqu'elle permettait d'envisager une exploitation rationnelle de cette espèce. Aussi, la culture du gorli fut-elle encouragée. En effet, les hauts salaires consentis à la main d'œuvre pour la récolte du café ne permettaient guère d'envisager une collecte du gorli au hasard de ses gîtes forestiers. Le Jardin botanique de Bingerville possède actuellement un hectare de gorli adultes, qui sont cultivés et récoltés au profit de l'Institut Marchoux.

Cependant, le beurre de gorli est d'un emploi assez difficile en raison de son point de fusion relativement élevé, de sorte qu'il n'est pratiquement utilisé que sous forme d'esters éthyliques.

Aussi, songea-t-on, très tôt, à introduire en Afrique les espèces asiatiques. C'est ainsi qu'au Centre expérimental de Sérédou, ont été acclimatées, avec succès, les principales espèces asiatiques : Taraktogenos Kurzii (vrai chaulmoogra de l'Inde), Hydnocarpus anthelmintica (Krabao indochinois), Hydnocarpus Wightiana (de Pondichéry). Les lipides de ces espèces sont plus fluides et peuvent être utilisés directement en injections.

A cette même époque, des efforts similaires étaient poursuivis au Congo belge pour implanter Hydnocarpus anthelmintica sous la direction de E. De WILDEMAN qui conclut dans son rapport : "les huiles ainsi obtenues ont des caractères voisins de ceux que possèdent les huiles issues de la même espèce végétale ailleurs qu'en notre colonie" [124].

Mais l'on n'interrompt pas pour autant la recherche et la prospection systématique des Flacourtiacées oléagineuses poussant spontanément dans les forêts africaines et capables de fournir des huiles douées de pouvoir rotatoire et, de ce fait, aptes à être examinées quant à leur activité thérapeutique.

Une nouvelle espèce fut décrite dès 1923 dans le Bulletin de l'Institut Impérial, sous le nom d'Oncoba spinoza. Mais malheureusement l'huile obtenue est fortement siccative et dépourvue du pouvoir rotatoire [20] de sorte que son étude n'a pas été poursuivie. D'autres représentants du genre Caloncoba ne tardèrent pas cependant à attirer l'attention.

En 1927, le Pharmacien Capitaine J. C. PEIRIER [91] en recherchant le Caloncoba echinata au Cameroun rencontra une autre espèce qui fut identifiée comme étant le Caloncoba glauca et dont "l'huile possédait un très haut pouvoir rotatoire destroyre". Encouragé par cette découverte, il se fit adresser un deuxième lot de graines, mais celles-ci ne présentaient pas les mêmes caractères botaniques que les précédentes et furent identifiées, à Marseille, par le Professeur JUMELLE, comme appartenant au Caloncoba Welwitschii. Les analyses de ces huiles ont été publiées en 1929 [90] et toutes leurs caractéristiques figurent dans la thèse que J. C. PEIRIER soutint en 1930 [89].

Vers la même époque, M. PERROT attirait l'attention sur l'huile de Caloncoba glauca [95] et R. MATHIVAT [69] donnait, dans sa thèse, les caractères des huiles de Caloncoba Welwitschii, auquel PASCALÉT [88] attribuait également "la composition de l'huile de Gorli".

Il ne faut pas manquer de souligner ici l'importante contribution que les auteurs belges ont apporté à l'étude des Caloncoba africains. En 1930, E. De WILDEMAN [123] publiait une étude très complète des principales espèces de Caloncoba rencontrées au Congo ainsi que leur répartition géographique dans la grande colonie Belge. Au terme de cette étude, une commission chargée de la préparation d'une enquête sur les plantes à huiles chaulmoogriques congolaises était constituée. Plus récemment, en 1932 puis en 1946, L. ADRIAENS [1 et 2] consacrait deux longues études à la composition des Flacourtiacées du Congo belge et, notamment, de Caloncoba Welwitschii et de Caloncoba glauca. La deuxième étude fait état de recherches récentes sur ces deux espèces et publie différents rapports d'organismes officiels [106 - 107] ainsi que les travaux de L. TIHON [118].

Mais le genre Caloncoba n'est pas le seul à fournir des huiles antilépreuses, leur présence ayant été, également, signalée dans des graines appartenant au genre Lindackeria. Ce genre n'est représenté, en Afrique, que par deux espèces, les autres appartenant à la forêt brésilienne et fournissant d'ailleurs des huiles possédant un pouvoir rotatoire élevé et utilisé au Centre International de la Lèpre de Rio de Janeiro. Mlle M. -Th. FRANCOIS indique dans son rapport de mission en A. O. F. [41] que les graines de Lindackeria dentata et Lindacke-

ria Gallei décrites par GILG et A. CHEVALIER ont été recueillies dans différentes régions de l'ancienne Guinée française. Leur analyse effectuée par le Pharmacien Capitaine Claude JARDIN a révélé une teneur assez élevée en huile optiquement active. Il semble, toutefois que la petite dimension des fruits monospermes pose une question de récolte qui paraît retirer tout intérêt pratique à l'exploitation de cette espèce.

Des travaux analogues ont été menés par ADRIAENS [2] qui a étudié les graines de Lindackeria dentata du Congo belge ainsi que les huiles du groupe chaulmoogrique qu'elles contiennent. Cet auteur indique la constitution chimique de ces huiles d'où il ressort que cette espèce serait beaucoup plus riche en acide hydnocarpique qu'en acide chaulmoogrique.

Les résultats obtenus par les différents auteurs ainsi que les nôtres seront groupés en plusieurs tableaux synoptiques. Et nous tenterons, ensuite, de comparer entre elles, les huiles des différentes espèces étudiées afin de rechercher celles qui, en raison de leur constitution chimique, mériteraient de voir leur emploi se généraliser.

CHAPITRE II

ÉTUDE BOTANIQUE ET CHIMIQUE DES ESPÈCES AFRICAINES

A - CLASSIFICATION ET CARACTERES BOTANQUES DES ESPECES PRODUCTRICES D'HUILES DE CHAULMOOGRA

La première étude complète de la famille des Flacourtiacées remonte à 1897, date à laquelle O. WARBURG [122] publiait dans la célèbre série de A. ENGLER "Die Natürlichen Pflanzenfamilien" la classification de la famille et la description des principaux genres. Quelques années plus tard, en 1908, GILG [46] reprenait cette étude à la lumière de l'expérience acquise au cours de longues expéditions botaniques. Entre autres modifications, il proposa de remanier le genre Oncoba, car il pensait que WARBURG, en y classant des espèces fort différentes, n'avait pas respecté les caractéristiques botaniques primitivement décrites par l'auteur de ce genre : FORSK. GILG proposa donc de diviser l'ancien genre Oncoba (entendu au sens large que lui donnait WARBURG), en deux genres nouveaux : le genre Oncoba proprement dit (entendu au sens strict que lui avait donné FORSK) et le genre Caloncoba. Dans le premier, seraient placées toutes les espèces dont l'appareil végétatif est pourvu d'épines, alors que dans le second seraient rangées les espèces non épineuses. Enfin, en 1925, GILG [45] remaniait de nouveau la classification de la famille qu'il divisait en XI tribus et 84 genres dont 19 pour la seule tribu des Oncobées. La récente flore d'Afrique Occidentale de HUTCHINSON et DALZIEL [56] publiée en 1954 conserve cette classification qui permet d'établir pour les genres africains producteurs d'huile de Chaulmoogra la clef suivante :

A - Péricorolle spiralée ou sans différenciation entre sépales et } Camptostylus
pétales. Pièces internes du péricorolle non écailleuses.

B - Péricorolle cyclique avec pétales ou sépales différenciés.

1/ Buissons ou arbustes avec des épines droites ou re- } Oncoba
courbées, pétioles courts.

2/ Arbustes ou arbres non épineux; pétioles souvent al-
longés.

- Grandes fleurs, à inflorescences courtes, axil- }
laires, stigmate crénelé ou ramifié, graines peti- } Caloncoba
tes et nombreuses, feuilles écailleuses ou finement
velues.

- Petites fleurs, inflorescences axillaires à longs }
pédoncules, stigmate non divisé ou légèrement lo- } Lindackeria
bé, graines peu nombreuses et souvent unique à
maturité, feuilles non écailleuses.

Il n'a pas été possible d'obtenir des différents services de Recherches fo-

restières toutes les espèces que nous aurions souhaité étudier et comparer. La récolte des espèces non cultivées, au hasard des gîtes forestiers naturels est évidemment fort aléatoire et exige un travail de prospection systématique long et difficile. Les échantillons qui nous sont parvenus appartenaient soit au genre Caloncoba, soit au genre Camptostylus. Avant d'entreprendre leur étude qu'il nous soit permis une fois encore de remercier tous ceux qui, durant plus de trois ans, et dans des conditions souvent difficiles, ont récolté et nous ont fait parvenir les lots de graines oléagineuses qui font l'objet de ce travail.

B - LES ESPECES DU GENRE CALONCOBA ET LEURS HUILES

1 - CARACTERES BOTANIQUES ET CLASSIFICATION -

La clef qui vient d'être reproduite indique les principaux caractères du genre Caloncoba. Dans la description minutieuse qu'il en donne, GILG signale encore comme spécifique du genre le fait que les fleurs possèdent trois sépales et de nombreux pétales (12 environ). L'auteur classe les différentes espèces du genre Caloncoba selon la clef suivante, qu'il n'est pas inutile de rapporter ici.

- Fruits épineux

- | | | |
|--|---|--------------------|
| a) Petites fleurs, naissant toujours à l'aisselle des feuilles, sépales de 6 à 8 mm de long, pétales de 8 à 10 mm ; feuilles oblongues, se terminant brusquement en pointe, de 10 à 30 cm de long, et 4 à 10 cm de large, pétioles de 2 à 3 cm de long. | } | <u>echinata</u> |
| b) Grandes fleurs naissant directement sur les rameaux, sépales de 1,5 à 2 cm de long, pétales de 3 à 3,5 cm ; feuilles ovales, arrondies ou cordiformes à la base, sommet fortement acuminé, 12 à 36 cm de long, 6 à 20 cm de large, pétioles de 5 à 22 cm de long. | } | <u>Welwitschii</u> |

- Fruits lisses

- | | | |
|---|---|-------------------|
| a) Etamines de moins de 1 cm de long, filets aussi longs que les anthères. | } | <u>Lophocarpa</u> |
| b) Etamines de plus de 3 cm de long, filets plus longs que les anthères. | | |
| - pétioles de 2 à 3 cm de long, fruit ellipsoïde. | } | <u>Brevipes</u> |
| - pétioles de 3 à 14 cm de long, fruit rond à la base. | | |
| . rameaux défoliés à la floraison | } | <u>Gilgiana</u> |
| . rameaux foliés à la floraison, feuilles elliptiques ou lancéolées, rondes ou s'atténuant en pointe à la base, longuement et étroitement acuminées, 11 à 25 cm de long, 4 à 8 cm de large, coriaces, la face supérieure devenant glauque, sépales de 2 cm de long, rapidement caduques, pétales de 3 à 6 cm de long, fruit généralement ovoïde, court-ement acuminé, 5 à 6 cm de long. | } | <u>Glauc</u> |

Cette clef permet une identification rapide de l'espèce. Seules les graines de Caloncoba echinata, Caloncoba Welwitschii, et Caloncoba glauca ont pu nous être adressées. Pour chaque espèce étudiée, nous indiquons ses caractères, son aire de dispersion géographique, et enfin les caractéristiques de l'huile obtenue. Remarquons que les valeurs indiquées dans nos résultats correspondent toujours aux lipides totaux extraits par l'éther de pétrole.

2 - CALONCOBA ECHINATA -

Cette espèce primitivement dénommée Oncoba echinata par OLIVER [86] fut rapportée au genre Caloncoba à la suite des travaux de WARBURG [122] et de GILG [46].

Elle était connue de tous temps par les indigènes de la Sierra Leone, qui l'utilisaient contre les affections de la peau sous le nom de "Gorli". Cette espèce semble très répandue en A.O.F. et dans les colonies britanniques du Nord du Golfe de Guinée. Par contre, elle semble très peu fréquente au Cameroun ou PEIRIER en a signalé quelques rares échantillons et elle fait totalement défaut au Gabon, au Congo Belge (E. De WILDEMAN ne la cite pas) et, de façon plus générale, dans toute l'Afrique Equatoriale.

GILG en donne la description suivante : "fleurs terminales, axillaires, solitaires ou fasciculées, non en grappe ; pétiotes de 2 cm de long. Feuilles ovales, oblongues, base arrondie à cunéiforme, sommet brusquement acuminé, de 10 à 30 cm de long, de 4 à 10 cm de large, 5 à 6 paires de nervures latérales principales faisant un angle de 80° avec la nervure médiane, fruit épineux". Cette description correspond à celle qu'en donnait OLIVER, de sorte que l'identification de cette espèce est certaine, et ne présente aucune difficulté. Le tableau n° 2 rassemble les résultats de toutes les analyses pratiquées sur les lipides de cette espèce. Nous possédions un échantillon de 50 kgs de graines cultivées au Jardin botanique de Bingerville.

Les huiles étudiées par les différents auteurs possèdent des caractères assez voisins. Seul l'échantillon originaire de la Guinée Espagnole diffère quelque peu par son faible rendement (mais l'épuisement a-t-il été total ?), son indice d'iode élevé et son point de fusion bas, ce qui révèle une teneur plus importante en acide diéthylénique liquide. Les autres résultats sont, par contre, très concordants, notamment en ce qui concerne l'indice d'iode et la déviation polarimétrique, d'où l'on peut conclure que la constitution glycéridique de ces huiles est sensiblement identique, quelle que soit leur origine géographique (qui d'ailleurs se situe toujours dans la zone méridionale et côtière de l'A.O.F., sauf précisément pour la Guinée Espagnole, limitrophe de l'ancienne A.E.F.). Il est frappant de constater l'analogie des résultats obtenus par Mlle M.-Th. FRANCOIS sur l'huile des graines cultivées à Soubré [40] et par nous sur l'huile des graines originaires de Bingerville.

Cette espèce est incontestablement celle dont les caractères botaniques et chimiques sont les plus stables, en comparaison des autres espèces africaines qui vont être étudiées maintenant ; grâce aux dimensions importantes des graines, et à leur haute teneur en une huile dont l'indice d'iode et la déviation polarimétrique est élevée, elle apparaît comme un heureux succédané des espèces asiatiques. Malheureusement, le point de fusion élevé du "beurre de Gorli" rend difficile son emploi en nature, de sorte qu'on ne l'utilise pratiquement aujourd'hui que sous forme d'esters éthyliques.

3 - CALONCOBA WELWITSCHII -

Cette espèce, comme la précédente, a été décrite pour la première fois en 1868 par OLIVER, sous le nom d'Oncoba Welwitschii, et ce fut GILG qui lui attribua la dénomination actuelle en 1908. L'on trouvera toute la synonymie dans l'étude déjà citée de E. De WILDEMAN sur les plantes à huiles chaulmoogriques du Congo Belge [123]. GILG a longuement hésité avant de ranger cette espèce dans le genre Caloncoba. Elle s'en distingue, en effet, par le mode de déhiscence des anthères et surtout par la naissance très curieuse des fleurs directement sur le tronc. Or, ces caractères se retrouvent dans le genre Paraphyadanthé (MILDBR). Hésitant quant à son appartenance, HUTCHINSON dans la première édition de sa flore publiée en 1927 ne cite pas cette espèce dans le genre Caloncoba, la considérant comme un intermédiaire entre les deux genres. Cependant, dans la seconde édition, l'auteur se range finalement à l'avis de GILG et place dans le genre Caloncoba cette espèce très particulière.

Tableau n° 2

Caloncoba échinata (GILG)

Caractéristiques des graines et de l'huile	Imperial Institute 1913 [19]		GOULDING & ACKERS 1913 [51] Sierra Leone	ANDRÉ & JOUATTE 1927 [3 & 58] Côte d'Ivoire	M. + Th. FRANCOIS 1929 [40] cultivé à Soubré Côte d'Ivoire	COLE & CARDOSO 1938 [29] Côte d'Ivoire	J. RAINERO 1954 [105] Guin. Esp.	NOUS-MEME cultivé à Binger ville (Côte d'Ivoire)
	n° 1	n° 2						
Dimensions des graines en mm	8 à 9 4 à 8	8 à 9 4 à 8	- -	- -	6 à 8 3 à 4	-	-	6 à 8 3 à 4
Poids moyen d'une graine (g)	0,046 46,6 ‰	0,046 46,6 ‰	- -	- 46 à 49 ‰	0,046 48 ‰	-	-	0,048 48,7 ‰
Rendement en huile	35 à 45°	35 à 45°	-	40 à 42°	44°	-	33 à 34°	41 à 42°
Point de fusion								
Indice d'acide	-	-	4,5	-	prat. nul.	-	11,2	1,8
Indice d'iode	99,7	96,8	99,7	98	96,9	96,4	100,6	96,2
Déviation polari- métrique	-	-	-	56° 10'	49° 55'	51° 70'	50° 5	50° 4'

ENGLER a signalé sa présence au Gabon en 1908. Il est abondant au Cameroun, au Congo Belge, au Gabon, en Angola, toujours dans les zones forestières.

La description qu'en donne R. MATHIVAT dans sa thèse [69] est très insuffisante. "Il ne se distingue de Caloncoba glauca auprès duquel il pousse souvent côte à côte, que par son fruit épineux, un peu analogue à nos châtaignes". La description donnée par PEIRIER [89] n'est guère plus complète ; cet auteur attire cependant l'attention sur le fait que "les fleurs grandes, blanches, odorantes, sont attachées au tronc par 3 ou 5".

A. BAUDON [7] par contre, qui étudia sous la direction de M. PERROT les Caloncoba de l'Afrique Equatoriale Française, en donne une description minutieuse. Il retient comme caractère fondamental le fait que les fleurs sont échelonnées sur les rameaux et jusque sur le tronc. Mais, en ce qui concerne les autres caractères, il conclut en ces termes : "l'espèce est très polymorphe, et une étude serrée serait nécessaire, car ces formes diverses peuvent avoir des graines possédant une teneur variable en huile ou même les caractères de celle-ci différents". En effet, toujours selon A. BAUDON, les caractères généralement retenus pour la systématique des Caloncoba, sont pour cette espèce, très variables : feuilles polymorphes, même sur le même arbre, glabréité (ce caractère avait été proposé par E. de WILDEMAN) plus ou moins grande selon l'âge des feuilles, taille qui peut être celle d'un arbuste ou d'un arbre. Aussi, dans la clef qu'il propose au terme de son étude, l'auteur considère-t-il le "groupe Caloncoba Welwitschii" caractérisé par ses fleurs échelonnées sur les rameaux et jusque sur le tronc, groupe au sein duquel de nombreuses variations sont possibles, pouvant également entraîner des variations dans la teneur et la composition de l'huile extraite.

Plusieurs arguments semblent plaider en faveur de la thèse de A. BAUDON. Tout d'abord, la flore de HUTCHINSON et DALZIEL nous l'avons vu, reconnaît la localisation particulière des fleurs de Caloncoba Welwitschii d'où elle conclut à l'affinité de cette espèce avec le genre Paraphyadanthé. Dès 1930, dans son étude sur les espèces à huile chaulmoogrique du Congo, E. de WILDEMAN attirait l'attention sur le fait que Caloncoba Welwitschii se présente au Congo "sous des aspects très divers, arbustes ou arbres à feuilles à développement très variable", et il conclut qu'il ne serait "nullement impossible que l'étude approfondie n'amène à distinguer dans cette série des formes et des groupes auxquels il faudrait peut-être accorder une valeur spécifique". Et, de fait, il suffit d'observer attentivement les photographies données pour cette espèce par R. MATHIVAT et par J.C. PEIRIER, pour être frappé par la forme différente des feuilles de ces deux échantillons.

Ces remarques nous paraissent devoir être faites afin de pouvoir interpréter le tableau n° 3 ou sont consignés les résultats obtenus par les différents auteurs qui ont procédé à l'analyse de l'huile de cette espèce. Le fait que les caractéristiques générales de ces divers échantillons sont beaucoup moins concordants que celles des huiles de Gorli figurant au tableau n° 2 paraît aller dans le sens des constatations de M. BAUDON. La première constatation qui s'impose porte sur le poids et la taille des graines : il semble qu'on puisse en distinguer deux types : les unes de petite taille dont le poids varie entre 0,020 g et 0,030 g, d'autres plus grandes pesant environ 0,035 à 0,040 g. Leur rendement en huile est cependant très voisin (le chiffre avancé par PEIRIER est très contestable).

Tableau n° 3

Caloncoba Welwitschii (GILG)

Caractéristiques des graines et de l'huile	MATHIVAT 1929 [69] Cameroun	PEIRIER 1930 [89] Cameroun	ADRIAENS 1932 [1] Congo B.	Rapport INEAC 1939 [106] Congo B.	SANTOS MERINO 1944 [113] Guin. Es.	GIL-QUINZA & RIBOSA 1946 [47] Guin. Es.	ADRIAENS 1946 [2] Congo B. (équateur)	NOUS-MEME 1955 Cam. Gabon
Dimensions des graines en mm	5 à 8 2 à 4	5 à 7 3 à 4	-	-	1 à 2 3 à 4	-	-	3 à 4 6 à 7
Poids moyen d'une graine (g)	0,037 à 0,046	0,033 à 0,047	0,020 à 0,029	-	-	-	0,020 à 0,029	0,035 0,020
Rendement en huile	44 %	35,6 %	46 %	46 %	-	-	46 %	44 %
Point de fusion	38°	40°	38 à 48°	-	36°4	34°5	-	32°
Indice d'acide	-	5,8	-	-	16,4	9,7	20,2	9,8
Indice d'iode	84 (Hanus)	99 (Hanus)	90 à 91,4	103,6	83	91,4	90	99,6
Déviation polari- métrique	51°40'	47°,7	42°,8 à 45°,8	48°20'	46°,8	49°,2	47°,14	51°25' 48°45'

Les graines originaires de la Guinée Espagnole, des régions équatoriales du Congo Belge et du Gabon sont toutes de faibles dimensions. Leur constitution chimique présente quelques caractères communs : en effet, ces huiles présentent toujours une déviation polarimétrique assez faible, et qui ne dépasse jamais 49° . Les indices d'iode sont également peu élevés, se maintenant le plus souvent aux environs de 90, et restant en tous cas toujours inférieurs aux valeurs obtenues pour les huiles de Caloncoba echinata. Or, si ces huiles possèdent des indices d'iode et des déviations polarimétriques relativement peu différentes, il faut remarquer aussi que leur origine botanique est très voisine. Les trois territoires dont elles proviennent appartiennent tous à la zone équatoriale ; on peut donc penser que ces différents échantillons de graines procèdent d'une même variété botanique de Caloncoba Welwitschii, laquelle serait particulièrement répandue dans la zone équatoriale.

Quant aux graines originaires du Cameroun, elles se caractérisent par leurs dimensions et leur poids beaucoup plus élevés ; sur ce point, les observations de PEIRIER et de MATHIVAT concordent étroitement avec les nôtres. Les huiles originaires de ces variétés semblent présenter une déviation polarimétrique plus élevée puisqu'elle dépasse toujours 51° (la valeur avancée par PEIRIER est discutable car il ressort de l'étude de ses travaux que les notions de pouvoir rotatoire spécifique et de déviation polarimétrique sont toujours confondues). Ces huiles sont donc plus riches en acides cyclopenténiques actifs.

Ainsi sera-t-on appelé à choisir les graines originaires du Cameroun, qui appartiennent sans doute à une variété différente de Caloncoba Welwitschii. Les variations climatologiques importantes entre le Cameroun et les régions proprement équatoriales jouent certainement un rôle non négligeable et peuvent aussi être considérées comme une des causes de la différence des constitutions chimiques des huiles de Chaulmoogra de ces deux régions.

4 - CALONCOBA GLAUCA -

Comme les deux espèces qui viennent d'être étudiées, celle-ci fut primitivement rangée en 1868 [86] par OLIVER dans le genre Oncoba, GILG, en 1908 [46] la classa comme la précédente dans le genre Caloncoba. Le Professeur Auguste CHEVALIER la rencontra en Côte-d'Ivoire au cours de son exploration botanique de 1920 [27]. En 1926, recherchant le Caloncoba echinata, au Cameroun, PEIRIER y découvrit le Caloncoba glauca dans la région d'Eséka. Sa répartition géographique est identique à celle de l'espèce précédente, et les deux espèces cohabitent très fréquemment : on le trouve au Cameroun, au Congo Belge, en Afrique Equatoriale, en A. O. F. et au Nigéria.

Si un caractère s'impose d'emblée et permet une distinction facile entre les espèces précédentes et celle-ci, c'est bien la présence d'un fruit totalement dépourvu d'aiguillons. Ce caractère mis à part, les descriptions qui ont été données pour cette espèce sont assez différentes. R. MATHIVAT et J. C. PEIRIER ne donnent que des indications assez succinctes à ce sujet. Peut être d'ailleurs serait-il ici aussi nécessaire de considérer différentes variétés de cette même espèce, car, si l'on compare les figures des études de PEIRIER et de E. De WILDEMAN pour le même Caloncoba glauca, il semblerait qu'il s'agisse de fruits nettement différents l'un étant presque sphérique, l'autre ovoïde, à moins que la figure donnée par E. De WILDEMAN ne représente un fruit à l'état jeune. Toutes ces constatations incitèrent A. BAUDON à entreprendre l'étude de cette espèce, comme il l'avait fait pour l'espèce précédente.

Cet auteur distingue le groupe "Caloncoba glauca" du groupe "Caloncoba Welwitschii" par ses fleurs isolées ou fasciculées à l'extrémité des rameaux. Puis l'auteur indique d'emblée "qu'il en est de cette espèce comme de Caloncoba Welwitschii ; il s'agit d'une plante à aire de répartition très vaste, présentant un polymorphisme accentué". Les distinctions entre les différents types tiennent aux caractères des fruits et des graines, à leur taille et à leur forme. L'auteur décrit ensuite une nouvelle espèce qu'il rattache au groupe du Caloncoba glauca,

Tableau n° 4

Caloncoba glauca (GILG)

Caractéristiques des graines et de l'huile	PEIRIER [89] 1930 Cameroun	Rapport 4ème Congrès Matières Coloniales 1935 [107] Congo Belge	TIHON [118] Congo Belge	INEAC [106] 1939 (Ngidinga) Congo Belge	ADRIAENS [2] 1946		NOUS-MEME	
					Ngidinga Congo Belge	Beni Congo Belge	1955 Cameroun	1956-57 Gabon
Dimensions des graines en mm	6 à 7 4 à 5	-	-	-	-	-	5, 5 à 7	4, 5 à 5, 5
Poids moyen d'une graine (g)	0, 117	0, 092	0, 089	-	0, 092	0, 038	0, 075	0, 055
Rendement en huile	40, 2 %	-	35, 75 %	45 %	32, 5 %	24, 5 %	38 %	37 %
Point de fusion	38 à 40°	-	-	-	-	-	29°	40°
Indice d'acide	3	2, 65	3, 25	15, 1	5, 38	22	9, 2	2, 8
Indice d'iode	84, 3	95, 7	98, 1	96, 1	95, 52	100, 08	105, 9	89, 8
Déviation polari- métrique	40°	45° 22'	46° 08'	48° 36'	45° 31	51° 45	52° 36'	41° 36'

en raison de la disposition des fleurs, mais dont l'ensemble des caractères fort distincts, en particulier la forme ovoïde et non sphérique du fruit, la localisation dans les forêts sèches, alors que tous les Caloncoba glauca croissent dans les marais ou au bord des rivières, l'autorisent à la considérer comme une espèce nouvelle qu'il appelle "Caloncoba Perrotii". Nous n'avons d'ailleurs jamais pu nous faire parvenir des graines de cette espèce.

Ainsi le groupe "Caloncoba glauca" se révèle-t-il encore plus complexe que celui étudié précédemment. L'on peut donc s'attendre à des différences sensibles, tant en ce qui concerne les caractères des graines que ceux des huiles correspondantes. C'est ce qui apparaît dans le tableau n° 4.

Un simple coup d'œil sur ces résultats révèle leur grande diversité. Non seulement les caractéristiques sont variables, mais la dimension des graines et leur poids varient eux-aussi, dans des proportions considérables, allant de 0,038 g pour les graines originaires de Beni au Congo Belge, à 0,117 g pour celles d'Eseka au Cameroun. Sans doute proviennent-elles de types botaniques différents, croissant sous des latitudes et des climats très variés, et récoltés à divers degrés de maturité. Le seul caractère commun de tous les échantillons de cette espèce est le rendement en huile moins élevé que celui des deux espèces qui viennent d'être étudiées.

En ce qui concerne les espèces originaires d'Afrique Française, les huiles provenant des graines originaires du Cameroun ont immédiatement attiré notre attention, avant même que nous ayons procédé à leur analyse. En effet, après avoir été portées à 60° en vue de subir une filtration, celles-ci sont ensuite restées fluides durant plus de 24 heures à la température du laboratoire. L'huile ne se prend ensuite en masse que très lentement, et le beurre obtenu a une consistance plus molle que celle des lipides des autres espèces. Le point de fusion est beaucoup plus bas. Enfin l'analyse révèle un pouvoir rotatoire et un indice d'iode très élevés, qui se situent en dehors des normes courantes des Caloncoba Africains, et très au-dessus. La déviation polarimétrique, l'indice d'iode révélant une teneur exceptionnelle en acide gras, le point de fusion bas qui permet de penser que ces graisses sont liquides dans leur territoire d'origine et qu'elles peuvent, par conséquent, être utilisées directement en injection, font de cette espèce, ou plus précisément de cet échantillon, une source d'huile de Chaulmoogra de grande valeur en tout point comparable aux huiles originaires de l'Inde, et appartenant aux espèces des genres Taraktoģenos et Hydnocarpus. Nous avons reçu ces graines grâce à l'amabilité des services de recherches forestières du Cameroun (SRFK) qui nous avaient adressé deux échantillons : l'un de 600 g le 19/8/1955, l'autre de 900 g le 16/12/1955. Malheureusement nous n'avons pas pu nous procurer d'autres échantillons de ces graines camerounaises, les modifications du statut politique du Cameroun et les troubles graves dont elles s'accompagnèrent ayant perturbé le fonctionnement de ces services. Il n'en reste pas moins que l'étude du Caloncoba glauca du Cameroun doit être poursuivie et nous pensons que la culture de cette espèce mériterait d'être tentée en vue d'obtenir des huiles liquides de haute activité thérapeutique. Nous pousserons d'ailleurs plus avant, dans la 4ème partie de ce travail, l'étude de cette espèce.

Les résultats obtenus par PEIRIER semblent contredire ces constatations : mais là encore, il y a lieu de les accepter avec circonspection : dissertant sur la valeur du pouvoir rotatoire de l'huile qu'il étudiait, il concluait, au terme de son étude : "ces variations (du pouvoir rotatoire) ne peuvent s'expliquer que par l'altération du corps gras ; on peut considérer cette valeur comme oscillant autour de 50°". Aussi sommes-nous tentés de croire que l'étude de cet auteur portait sur un échantillon d'huile altérée ou oxydée, ne possédant plus, en tous cas, les caractères du produit original. Ceci est d'autant plus vraisemblable que les travaux antérieurs du même auteur indiquaient que l'huile de Caloncoba glauca était de consistance demi-solide, cependant que le pouvoir rotatoire s'élèverait à 60°8 (résultat manifestement trop élevé et qui provient semble-t-il de la dé-

termination par l'auteur du pouvoir rotatoire sur des solutions beaucoup trop diluées, de sorte que le résultat obtenu manque totalement de précision.

Quant aux graines originaires du Gabon, et qui nous furent adressées par la section des recherches forestières de ce territoire, le 2 février 1956 et le 21 février 1957, leurs dimensions sont plus réduites, et l'huile qu'elles contiennent est de médiocre qualité, si l'on considère l'indice d'iode et surtout le pouvoir rotatoire relativement bas. Leur emploi ne semble pas devoir se généraliser dans la thérapeutique antilépresseuse.

C - LES GRAINES ET L'HUILE DE CAMPTOSTYLUS MANNI

Lorsque le genre Oncoba crée en 1868 par OLIVER fut démembré par WARBURG et GILG en 1908, Oncoba Mannii Oliv. devint Caloncoba Mannii Gilg. à l'instar des diverses espèces déjà étudiées précédemment. Cependant, cette espèce se différencie très nettement des précédentes par ses fleurs beaucoup plus petites, plus nombreuses et disposées en racèmes terminaux et subterminaux. Ce caractère avait été retenu par OLIVER qui le considérait comme commun à 4 espèces : Oncoba dentata (Oliv.), Oncoba Mannii (Oliv.) Oncoba ovalis (Oliv.) et Oncoba aristata (Oliv.). En 1908, GILG classa ces trois dernières espèces dans le genre Caloncoba, cependant que la première devenait le type du genre Lindackeria, sous le nom de Lindackeria dentata (Gilg). Quelques années plus tard cependant, GILG remania cette classification et transféra les trois dernières espèces dans le genre Camptostylus qu'il avait décrit pour la première fois en 1898, et dont les principaux caractères sont indiqués dans la clef reproduite plus haut. Elles figurent sous ce nom dans le supplément de l'index de KEW, publié en 1925. De sorte que cette espèce eut successivement les trois dénominations suivantes : Oncoba Mannii (Oliv.) puis Caloncoba Mannii (Gilg), et enfin Camptostylus Mannii (Gilg). Cependant la flore d'HUTCHINSON et DALZIEL de 1927 continua à la classer dans le genre Caloncoba, de sorte que c'est sous cette dénomination que l'ont désigné les différents auteurs qui l'ont rencontrée dans leurs explorations. Mais dans la 2ème édition de cet ouvrage, publiée en 1954 [56], elle figure dans le genre Camptostylus.

A. BAUDON l'a signalée en A. E. F. et en donne dans son rapport une description détaillée : la disposition des fleurs en racèmes, la taille réduite des pièces florales, les étamines très nombreuses à anthères longuement acuminées s'ouvrant par deux fentes longitudinales, le fruit lisse sont, selon cet auteur, les principales caractéristiques de l'espèce. E. De WILDEMAN la signale également au Congo Belge, sous le nom de Caloncoba Mannii GILG. Elle existe aussi au Nigéria et au Cameroun.

Nous devons à la diligence de la section de recherches forestières du Gabon les deux échantillons que nous eûmes à notre disposition, l'un de 150 g, envoyé le 3 février 1958, l'autre de 900 g, envoyé le 17 décembre de la même année. Les graines sont peu nombreuses dans le fruit, affectant la même forme que celles de Caloncoba glauca, mais de taille bien plus importante, qui les font singulièrement ressembler à des petits cailloux.

La seule étude portant sur cette espèce avait été effectuée à Madrid, par le Professeur C. GONZALEZ-GOMEZ et A. PEREIRA [49]. Les résultats indiqués par ces auteurs, comme le prouve le tableau n° 5, coïncident assez bien à ceux que nous avons obtenus lors de l'analyse de l'huile extraite par l'éther de pétrole. Cependant il semble bien que les graines étudiées par le Professeur GONZALEZ-GOMEZ aient été récoltées bien avant maturité comme permet de le supposer l'indice d'acide très élevé des huiles qu'elles contiennent. Ceci expliquerait le rendement plus faible obtenu par ces auteurs, ainsi que les dimensions plus réduites des graines qu'ils ont examinées.

Les graines originaires du Gabon sont de taille relativement importante et

se caractérisent par la finesse de leur coque. Celle-ci ne représente en effet que 11% du poids de la graine, alors qu'elle correspond à 32 % pour les graines du Caloncoba glauca du Gabon et pratiquement autant pour les graines de Caloncoba Welwitschii. C'est ce qui explique la très forte teneur en huile de ces graines, rendement qui dépasse celui de toutes les autres graines de Flacourtiacées Africaines connues jusqu'ici.

Tableau n° 5

Camptostylus Mannii (GILG)

Caractéristiques des graines et de l'huile	GONZALEZ-GOMEZ & A. PEREIRA 1946 - [49] Guinée Espagnole	NOUS-MEME 1958 Gabon
Dimensions des graines en mm	-	5 à 6 9 à 11
Poids moyen d'une graine (g)	0,05	0,20 à 0,22
Rendement en huile	41,1 %	51,8 %
Point de fusion	36 à 38° 5	46°
Indice d'acide	46,2	6,1
Indice d'iode	80,7	73,3
Déviation polarimétrique	40° 5	39° 50'

L'huile, par contre, est de qualité très médiocre : l'indice d'iode et le pouvoir rotatoire particulièrement bas, révèlent un taux très élevé en acide linéaire saturé, dépourvu d'activité thérapeutique. De plus, le point de fusion très haut rend difficile l'usage direct de l'huile en injection. Par contre, les esters peuvent être préparés, puis distillés : l'on pourra ainsi éliminer comme nous le verrons plus loin, la plus grande partie de l'acide palmitique, sous forme de palmitate d'éthyle, et obtenir, en queue de distillation, les esters des acides optiquement actifs.

D - CONCLUSIONS

En ce qui concerne Coloncoba echinata, la stabilité des caractères botaniques de l'espèce et de la constitution chimique de l'huile est frappante. Toutes les analyses mènent à des résultats pratiquement identiques. La taille des graines, leur rendement en huile, le point de fusion et l'indice d'iode de celle-ci sont les mêmes pour tous les échantillons. Il s'agit donc d'une espèce bien déterminée, peu polymorphe. Son aire de dispersion géographique, il est vrai, est limitée aux seules régions forestières en bordure nord du Golfe de Guinée, de sorte qu'elle se développe toujours sous le même climat. Sa culture n'en modifie nullement les caractères et peut donc être poursuivie sans dommage. C'est ce qui fait l'originalité et l'intérêt de cette espèce dont la culture doit être poursuivie et développée. Son rendement élevé, sa forte teneur en acides cyclopenténiques en font un médicament de choix. Malheureusement le point de fusion trop élevé ne permet pas son emploi direct en injections.

Les graines de Camptostylus Mannii sont susceptibles de fournir des quantités importantes d'huile. Mais la déviation polarimétrique révèle un taux peu

élevé d'acides cyclopenténiques. Cette espèce ne doit pas cependant être rejetée d'emblée, en raison de son très haut rendement en huile.

Restent les graines de Caloncoba Welwitschii et Caloncoba glauca et les huiles qu'elles renferment. Il est difficile de tirer des conclusions quant aux espèces congolaises ; les variations observées dans ces échantillons sont sans doute dues au fait que les graines ont été récoltées en des régions différentes de l'immense colonie belge, ou les conditions climatiques et hydrologiques peuvent être également très différentes. Nous manquons de documents à ce sujet pour prendre position. Par contre, si nous observons les espèces originaires des Territoires de la Communauté, que nous avons nous-mêmes analysées, une constatation s'impose d'emblée : les graines originaires du Cameroun sont de taille plus importante que celles provenant du Gabon ; leur rendement en huile est très légèrement supérieur ; enfin les caractéristiques de leurs huiles répondent mieux aux critères analytiques d'huiles thérapeutiques que celles provenant de graines originaires du Gabon ; le fait est déjà remarquable pour Caloncoba Welwitschii, mais il est particulièrement net pour Caloncoba glauca. Aussi faudrait-il envisager avec plus de faveur les espèces camerounaises, et tenter leur exploitation en vue d'obtenir des huiles directement utilisables dans la thérapeutique antilépreuse.

Cependant, avant de généraliser et de considérer ces résultats comme définitifs, il serait nécessaire d'entreprendre l'étude botanique comparée des arbres fournissant les graines de l'un et de l'autre type. Peut-être devraient-ils être considérés comme des variétés différentes d'une même espèce. Il faudrait aussi effectuer chaque année les analyses d'huiles provenant des mêmes arbres et suivre les résultats obtenus : en effet, il est probable que les qualités des huiles originaires de graines provenant du même arbre varient selon que l'année a été pluvieuse ou ensoleillée plus chaude ou, au contraire, plus tempérée, etc. Mais une telle étude ne pourrait être menée que sur les lieux mêmes de la production, et par la même personne qui, ayant à la fois les compétences requises en botanique et en chimie végétale, pourrait embrasser le problème dans son ensemble et y apporter une réponse définitive, que nous n'avons pu ici qu'entrevoir.

TROISIÈME PARTIE

EXTRACTION DES HUILES DE CHAULMOOGRA PAR L'ÉTHANOL BOUILLANT ET PRÉPARATION DE LEURS ESTERS ÉTHYLIQUES

TITRE 1: PRÉPARATION DES HUILES

CHAPITRE I

RECHERCHE D'UNE MÉTHODE D'EXTRACTION

A - LA PREPARATION ACTUELLE DES HUILES ANTILEPREUSES

La fabrication de l'huile d'Hydnocarpus Wightiana était due, jusqu'à une date récente, à l'activité des pharmaciens du Corps du Service de Santé des Troupes Coloniales qui ont poursuivi, tour à tour, à Pondichéry, l'œuvre entreprise par le Pharmacien-Colonel LAFFITTE. La matière première était achetée aux habitants du pays qui la récoltaient sur les arbres spontanés des régions forestières voisines de Pondichéry. Les graines étaient ensuite broyées, additionnées d'eau et pressées. Après filtration, l'huile se présentait sous l'aspect d'un liquide plus ou moins coloré dont la fluidité dépendait de la température extérieure. L'huile de chaulmoogra brute, livrée à l'Institut Marchoux, présentait une acidité libre plus ou moins accentuée et variable selon les conditions de fabrication. Pour l'utiliser en nature, il était nécessaire de la neutraliser, ce qui exigeait l'emploi d'une lessive alcaline, l'élimination des savons par plusieurs lavages avec de l'eau bouillante et la dessiccation de l'huile au moyen de sulfate de sodium anhydre. Mais les rendements ainsi obtenus ne sont jamais précisés. Sans doute, devaient-ils être généralement assez bas.

Cependant, la demande de médicaments chaulmoogriques dépassant les disponibilités d'huile asiatique, l'Institut Marchoux s'adressa alors aux espèces africaines et fit récolter, dès 1952, des graines de gorli. Mlle M. -Th. FRANCOIS [41] indique, dans son rapport de mission, les rendements obtenus lors de la pression de ces graines par les soins d'une huilerie industrielle de Haute-Volta. Trois tonnes de graines avaient fourni 1 125 kgs de graisse, soit un rendement de 37,5% en huile brute; rendement qui, on le voit, est très nettement inférieur au rendement obtenu lorsque les graines sont épuisées par l'éther de pétrole, (voir tableau n° 2). De plus on a constaté au cours des opérations de neutralisation, pratiquées, il est vrai, avec des moyens de fortune, une perte de 30 %; ce qui ramène le rendement définitif en huile neutre à une valeur voisine de 25 %.

Ainsi les rendements obtenus par pression sont-ils très inférieurs aux rendements obtenus par épuisement au moyen de l'éther de pétrole. L'utilisation de solvants organiques appropriés remplacerait donc très avantageusement semblerait-il l'extraction par pression.

B - CHOIX D'UN SOLVANT

Un bon solvant doit répondre à une série de conditions qui ne se trouvent généralement pas réunies pour un même produit. On est donc amené à faire un choix et à considérer un ensemble de propriétés favorables en sacrifiant délibérément d'autres caractères.

Parmi les solvants les plus couramment utilisés, figure l'essence B. C'est un mélange de carbures d'hydrogène provenant de la distillation du pétrole brut et constitué essentiellement par l'hexane et ses homologues inférieurs et supérieurs correspondant à la coupure 60-80° C. Ce solvant couramment dénommé "éther de pétrole" ne permet, cependant, pas de séparer sélectivement les glycérides des acides gras libres contenus dans la graine. Aussi l'huile obtenue doit-elle subir ensuite des opérations de neutralisation, toujours délicates et qui diminuent le rendement.

Jusqu'à une époque très récente, les solvants oxygénés, notamment les alcools, avaient servi, soit dans les recherches de laboratoire pour extraire à partir de tissus animaux ou végétaux des complexes biologiques très particuliers (on utilisait l'éthanol pour extraire les lipoprotéides), soit pour l'extraction de l'huile de ricin soluble dans l'éthanol et difficilement extractible par les carbures d'hydrogène, soit enfin, pour se livrer, sur les huiles, à divers procédés de raffinage. Ainsi le Codex préconise de neutraliser l'huile d'olive destinée aux injections hypodermiques par lavage avec de l'éthanol ; les acides gras libres étant, en effet, beaucoup plus solubles dans ce solvant que les glycérides, sont entraînés et se retrouvent en solution dans la phase alcoolique. L'utilisation de l'éthanol devrait donc permettre d'obtenir facilement des huiles neutres, et c'est pourquoi nous l'avons choisi pour l'extraction des huiles antiléprouses.

C - HISTORIQUE DE L'EXTRACTION PAR L'ALCOOL

En fait, l'emploi de l'alcool dans le traitement des corps gras n'est pas nouveau puisqu'il remonte à 1823, époque où CHEVREUL, essaya le fractionnement du beurre par l'alcool. Mais il fallut attendre une centaine d'années pour voir l'utilisation de ce solvant entrer dans la technique de l'extraction des huiles.

C'est, semble-t-il, un brevet français demandé à Paris, le 24 Juin 1924 [18] et exploité en Chine qui a ouvert la voie en proposant l'extraction de la graine de soja par l'alcool. Mais c'est aux japonais que la littérature américaine attribue le mérite d'avoir les premiers songé à utiliser l'alcool pour le traitement des huiles de soja [11]. Les auteurs allemands, ultérieurement, ont repris ces travaux et ils ont envisagé plusieurs modes d'extraction par l'éthanol dont le procédé Bellman. Ils ont utilisé en outre, des mélanges en proportions variables d'éthanol et d'autres solvants organiques [9], opération déjà réalisée par SCHWARTZ en 1937 [115] qui procéda à l'extraction industrielle du soja par un mélange d'alcool et de benzène. La même année C. F. EDDY [39] proposa, pour l'extraction de l'huile de coton, d'effectuer un premier épuisement par l'alcool suivi d'un second traitement par le benzène afin d'augmenter le rendement. Après la guerre, BECKEL [10] et ses collaborateurs ont perfectionné le procédé d'extraction de l'huile de soja par l'alcool en démontrant la possibilité d'opérer en continu par recyclage de la phase alcoolique venant d'une opération précédente : en effet, le refroidissement du miscella comme nous le verrons, entraîne la séparation spontanée d'une phase huileuse et d'une phase alcoolique. Après séparation de la phase huileuse par simple décantation, ils réutilisaient directement la phase alcoolique afin de poursuivre l'extraction sans avoir à recycler le solvant ; d'où un gain appréciable de temps et de calories.

Dans tous les cas, l'on observe que les huiles extraites par l'éthanol sont très peu acides, la plus grande partie des acides gras libres de la graine restant en solution dans la phase alcoolique. De plus, les rendements en huile sont fa-

vorables, si l'on opère à température élevée et au besoin, sous une légère pression. De sorte que l'utilisation de l'alcool se conçoit tout spécialement dans le cas des matières premières récoltées ou stockées dans des conditions défec- tueuses, donc très riches en acides libres : l'alcool aurait alors l'avantage de réaliser outre l'extraction, un premier raffinage donnant une huile capable d'être utilisée comme huile alimentaire alors que sa trop forte acidité l'aurait condam- née à des usages moins nobles. Telles sont les conclusions des travaux réalisés au Laboratoire Chevreul sous la direction de Mlle M. -Th. FRANCOIS, sur l'ex- traction des graines par l'alcool. Le procédé a été étendu ensuite à l'arachide et au colza par J. MAYOLLE [70, 71] au germe de maïs par Mme A. VIEUX [21] et à la graine de lin par K. KHANGY [63].

L'extraction par l'éthanol bouillant des huiles de chaulmoogra n'avait pas encore été étudiée. Cependant, GUILLERM, BANOS et NGUYEN VAN LIEN [52] à l'Institut Pasteur de Saïgon, eurent l'idée de mettre à profit la très grande so- lubilité des acides gras dans l'éthanol, même à froid, pour obtenir une huile neutre par extraction directe : ils indiquent le procédé suivant "la poudre des amandes, obtenue par broyage, est mise à macérer pendant quelques heures dans un récipient clos avec de l'alcool à 95° en quantité suffisante pour la recou- vrir complètement... ", ce mélange est ensuite porté sous la presse hydraulique. L'extraction est largement facilitée et le liquide qui s'écoule se divise en deux couches, la couche inférieure est constituée par l'huile neutre à peine colorée, tandis que la couche surnageante renferme la solution alcoolique des acides gras libres et des lipoides". Ce procédé présente un intérêt incontestable dans la mesure où il permet l'obtention rapide d'une huile sensiblement neutre. Mais les auteurs n'ont pas indiqué le rendement, probablement assez bas, en raison du protocole opératoire : les glycérides étant presque totalement insolubles dans l'alcool froid, le rendement ne devait sans doute pas dépasser celui obtenu par simple pression. Aussi le procédé ne semble-t-il pas s'être développé.

Par contre, en réalisant l'extraction des huiles de chaulmoogra par l'étha- nol bouillant, il devait être possible d'obtenir une huile neutre avec un rende- ment peu différent de celui observé lors de l'extraction au moyen de l'éther de pétrole, c'est-à-dire correspondant à la totalité des lipides contenus dans la graine. C'est ce que nous avons tenté de réaliser dans la troisième partie de ce travail.

CHAPITRE II

MARCHE DE L'EXTRACTION

A - METHODE D'EXTRACTION EMPLOYEE

Toutes les extractions ont été effectuées grâce à un dispositif expérimental imaginé par Mlle M. -Th. FRANCOIS et réalisé par les Ets PROLABO. Nous reproduisons ci-contre le schéma de cet appareil qui est utilisé couramment au laboratoire depuis plusieurs années et a toujours donné entière satisfaction. Il fonctionne en continu et permet l'épuisement de toutes les graines oléagineuses par n'importe quel solvant organique de densité supérieure à celle de l'huile. La matière première à épuiser est placée dans un cylindre de verre dont la base est constituée par un disque de verre fritté qui surmonte un ballon contenant le solvant porté à l'ébullition. Les vapeurs de solvant montent dans un second cylindre concentrique au premier et de diamètre légèrement supérieur. Elles se condensent à la partie inférieure d'un réfrigérant à bords festonnés, placé au sommet du dispositif, ce qui permet un arrosage bien réparti et continu de la masse à épuiser par le solvant. Le solvant traverse le tourteau de haut en bas et entraîne l'huile à travers le verre fritté. Le miscella s'enrichit donc en lipides et l'appareil fonctionne en extraction continue.

Ce procédé présente un certain nombre d'avantages sur les procédés classiques et, en particulier, sur le procédé de Soxhlet couramment utilisé en chimie extractive. La méthode de Soxhlet est trop connue pour qu'il soit nécessaire de la décrire ici. Mais elle ne permet de travailler qu'à la température ordinaire : les lipides sont, en effet, épuisés par le solvant froid. Or il est bien établi que la solubilité des lipides, comme d'ailleurs celle de la plupart des substances, est plus grande et plus rapide si l'on élève la température du solvant. Notre procédé permet de réaliser l'extraction à une température très voisine du point d'ébullition du solvant utilisé, les vapeurs de solvant constituant une gaine chauffante autour de la matière première à épuiser de sorte que la solubilité des lipides s'en trouve augmentée ; l'extraction est donc beaucoup plus rapide, donc plus économique. De plus l'appareillage est moins fragile que celui de KUMAGAWA et sa capacité est supérieure.

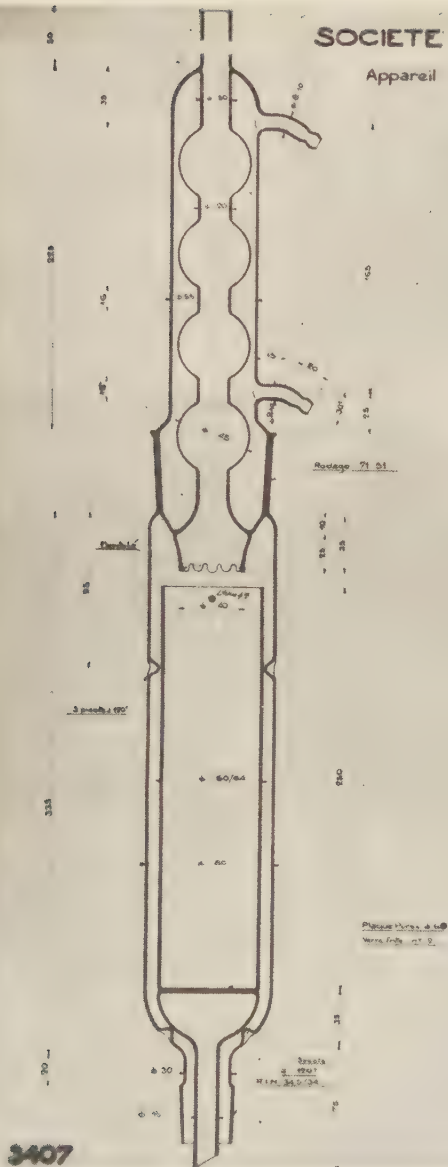
B - RENDEMENT DE L'EXTRACTION

Pour que l'épuisement s'effectue dans de bonnes conditions et permette l'extraction de la totalité des lipides contenus dans la matière première oléagineuse, il est nécessaire de tenir compte d'un certain nombre de facteurs qu'il n'est pas inutile, croyons-nous, de rappeler ici.

L'état de division dans lequel ont été amenées les graines oléagineuses influe directement sur la vitesse et le rendement de l'extraction, celle-ci n'étant totale que si les graines oléagineuses ont été soigneusement pulvérisées. Des

SOCIETE PROLABO

Appareil d'extraction
à chaud



graines grossièrement broyées conservent une quantité de lipides qu'il est impossible d'extraire sans une nouvelle pulvérisation. Malheureusement, il est difficile d'amener à un degré de division convenable des graines oléagineuses dont la teneur en lipides atteint ou dépasse 50 % : en effet, la masse devient rapidement pâteuse, et grippe le moulin. Dans ce cas, il est nécessaire de procéder à un second broyage après qu'une partie importante des lipides aient déjà été extraits par le solvant. Pour des graines contenant moins de 45 % de lipides, on peut extraire la totalité des lipides en une seule opération, si l'on a pris soin de broyer d'abord les graines au moulin, puis de les passer au "mixer" qui permet d'obtenir un degré de pulvérisation très suffisant.

On augmente très légèrement la vitesse d'extraction lorsqu'on prend soin de chauffer la matière première broyée avant de la placer dans l'extracteur. Par contre, il faut proscrire à tout prix le chauffage des graines avant leur broyage. Il est en effet très difficile de pulvériser des graines qui ont été préalablement portées à l'étuve car la masse devient immédiatement pâteuse et grippe le moulin.

C - OBSERVATION DU PHENOMENE

1 - PENDANT L'EXTRACTION -

Les phénomènes observés lors de l'extraction par l'éthanol ont été sensiblement identiques quelle que soit la graine oléagineuse placée dans l'extracteur. Dès que l'éthanol a imprégné la matière première de haut en bas, des gouttelettes jaunes traversent la paroi de verre fritté, et l'alcool bouillant contenu dans le ballon se colore rapidement. Une observation plus attentive montre qu'il n'y a pas seulement dissolution de l'huile dans l'alcool chaud mais aussi entraînement : on distingue, en effet, de minuscules gouttelettes huileuses en suspension dans l'alcool qui traverse le verre fritté. Il y a donc, à la fois, dissolution et déplacement des lipides par l'alcool. Tandis que l'extraction se poursuit, le miscella bouillant continue de jaunir, se chargeant de substances dissoutes puis, à un certain moment, se trouble : à ce stade la solubilité maxima des glycérides dans l'alcool bouillant est atteinte. L'extraction se poursuivant, le miscella se trouble et fonce davantage. Il suffit de recevoir quelques gouttes d'alcool ayant traversé le tourteau sur une capsule de verre et de les évaporer dans l'étuve pour déterminer la fin de l'épuisement qui correspond à l'absence de résidu huileux dans la capsule.

2 - PENDANT LE REFROIDISSEMENT -

On cesse alors le chauffage et le ballon contenant le miscella est abandonné au refroidissement. Tandis que la température s'abaisse, on observe de minuscules gouttelettes d'huile s'agglomérer au sein du miscella et qui se déposent lentement au fond du ballon ou elles constituent une phase liquide qui se solidifie dès que la température est suffisamment basse.

Après plusieurs heures, voire un jour de repos, le contenu du ballon apparaît généralement de la façon suivante :

- une fraction lipidique solide s'est séparée de la phase alcoolique et se présente sous deux aspects - au fond du ballon, une "masse amorphe" plus ou moins colorée en jaune, constituant un beurre homogène et dense ; - sur les bords et au sein de la solution mère, des cristaux blancs, pouvant présenter des formes très variables.

- une phase alcoolique surnageante qui est parfaitement limpide mais très colorée.

- enfin, on observe parfois une phase intermédiaire constituée par une très mince pellicule d'une substance solide qui recouvre la phase lipidique

ayant précipité au fond du ballon. Cette phase intermédiaire fait parfois défaut ou se réduit à quelques fins grumeaux.

L'on procède alors à la séparation de ces divers constituants.

D - SEPARATION DES DIFFERENTS CONSTITUANTS

1 - DE LA FRACTION LIPIDIQUE -

La phase alcoolique liquide est décantée et filtrée. Les cristaux (qui dans certains cas peuvent faire défaut, la phase lipidique étant alors uniquement constituée par les lipides amorphes précipités au fond du ballon) sont recueillis sur le filtre et lavés par de l'éthanol. Les lipides amorphes sont également lavés par de l'éthanol. Cristaux et lipides amorphes sont réunis et chauffés jusqu'à liquéfaction ; ils restituent une partie de l'alcool qui avait été retenue et qui se sépare, alors que sur l'huile liquide surnagent les grumeaux constituant la phase intermédiaire. Le mélange est porté dans un petit ballon et le solvant est distillé sous gaz inerte (azote) et pression réduite pour éviter toute oxydation des glycérides. Il est important de poursuivre assez longtemps cette opération car les dernières traces d'alcool sont longues à éliminer. En fin de distillation il se produit parfois une mousse abondante nécessitant une légère augmentation de la pression dans le ballon et une réduction du débit d'azote. Lorsque le courant de gaz inerte ne provoque plus de mousse l'on peut considérer que tout le solvant est éliminé. Bien entendu pour s'en assurer, il suffira de poursuivre la distillation afin de vérifier que le poids du ballon reste bien constant.

2 - DE LA PHASE INTERMEDIAIRE -

L'huile ainsi obtenue est trouble et contient notamment les grumeaux provenant de la dissociation de la mince pellicule constituant la phase intermédiaire précédemment décrite. Par filtration, on obtient une huile limpide, d'odeur caractéristique qui se solidifie rapidement par refroidissement. Les grumeaux recueillis sur le filtre sont lavés plusieurs fois par de l'éther de pétrole qui les débarrassera de toute trace d'huile. Ils sont ensuite séchés et seront conservés en vue d'une étude ultérieure.

3 - DE LA PHASE ALCOOLIQUE -

La phase alcoolique peut être directement employée dans une seconde extraction ; cette opération est couramment utilisée dans l'extraction industrielle par l'alcool sous le nom de "recyclage". Elle permet d'éviter une rectification du solvant après chaque opération, donc de réaliser une importante économie de temps et de calories. Pour notre part, nous avons préféré analyser qualitativement et quantitativement les substances restées en solution. La solution alcoolique a donc été distillée sous pression réduite et sous courant d'azote : la totalité de l'alcool mis en œuvre dans l'extraction est ainsi récupérée et elle pourra servir à des opérations ultérieures : le résidu présente l'aspect d'une masse rougeâtre visqueuse, d'odeur forte et caractéristique, de saveur sucrée et amère.

Ce résidu est épuisé par de l'éther de pétrole bouillant afin d'extraire tous les lipides qui seraient restés dissous en phase alcoolique. Les solutions éthéro-pétroliques ainsi obtenues sont toujours très colorées. Après séchage sur du sulfate de sodium anhydre, elles sont distillées sous pression réduite et dans un courant de gaz inerte : les lipides ainsi extraits de la phase alcoolique seront analysés et comparés aux lipides spontanément précipités par refroidissement. Leur caractère essentiel étant leur très forte teneur en acides gras libres, nous les qualifierons de "lipides acides".

Quant au résidu insoluble dans l'éther de pétrole, il est constitué par l'ensemble des substances solubles dans l'éthanol bouillant et de nature non lipidique qui seront étudiées ultérieurement.

CHAPITRE III

ÉTUDE COMPARÉE

DES LIPIDES EXTRAITS PAR L'ÉTHANOL ET PAR L'ÉTHÉR DE PÉTROLE

Les différents lots de graines en notre possession ont été épuisés par l'éthanol bouillant. Les fractions lipidiques obtenues : lipides précipités au sein de la phase alcoolique et lipides acides restés en solution ont été séparés, puis analysés. Nous avons, d'autre part, épuisé ces mêmes échantillons de graines par de l'éther de pétrole afin de comparer les lipides totaux ainsi obtenus aux lipides résultant de l'extraction par l'éthanol bouillant. La déviation polarimétrique, l'indice d'acide et l'indice d'iode ont été systématiquement déterminés : de ces valeurs l'on peut en effet tirer des indications précises sur la constitution chimique et, par conséquent, l'activité pharmacologique des huiles de chaulmoogra. Les résultats obtenus figurent dans le tableau n° 6.

A propos de ces résultats, nous avons fait les remarques suivantes :

A - RENDEMENT

Le poids des lipides précipités au sein de la phase alcoolique au cours du refroidissement des miscella est toujours inférieur à celui des lipides totaux extraits par l'éther de pétrole et ceci pour deux raisons :

- d'une part, la phase alcoolique retient en solution, comme nous l'avons vu, une petite quantité de lipides.

- d'autre part, le rendement total de lipides extraits par l'éthanol (c'est-à-dire la somme des lipides précipités et des lipides acides) reste toujours légèrement inférieur au rendement obtenu si l'on pratique l'extraction au moyen de l'éther de pétrole.

L'examen ultérieur des courbes d'extraction qui expriment le rendement obtenu en fonction du temps permettra d'interpréter ce phénomène : en fin d'extraction, la courbe devient presque asymptote à une parallèle à l'axe des abscisses, de sorte qu'il est très difficile d'extraire par l'éthanol bouillant les dernières traces de glycérides. La perte en lipides ainsi constatée est généralement de l'ordre de 2 % environ.

Tableau n° 6

Caractères comparés des fractions lipidiques

NATURE et ORIGINE DES HUILES	RENDEMENT pour 100 g de graines			INDICE D'ACIDE			INDICE D'IODE (WIJS)			DEVIATION POLARIMETRIQUE			
	E. P.	Ethanol		E. P.	Ethanol		E. P.	Ethanol		E. P.	Ethanol		
		L. totaux	L. préc.		L. ac.	L. totaux		L. préc.	L. ac.		L. totaux	L. préc.	L. ac.
Camptostylus Mannii (Gabon)	51, 8	47	2, 5	6, 1	1	98	73, 3	74, 5	65, 6	39° 50'	40° 50'	25° 20'	
Caloncoba Welwitschii (Gabon)	44	40	3, 8	12, 1	1, 7	93, 7	93, 8	95, 2	85, 6	48° 45'	49° 35'	19° 45'	
Caloncoba echinata (Côte d'Ivoire)	48, 7	45	1, 7	1, 8	0, 5	59	96, 2	95, 4	98, 6	50°	50° 42'	28° 30'	
Caloncoba Welwitschii (Cameroun)	46	42	3, 5	9, 8	0, 9	102	99, 4	99, 8	93, 7	51° 25'	51° 40'	26° 20'	
Caloncoba glauca (Cameroun)	38	35	2, 5	9, 2	1	81	105, 9	105, 4	109	52° 36'	52° 50'	29° 50'	

Comme l'on pouvait s'y attendre, les lipides précipités au sein de la phase alcoolique présentent toujours une acidité très faible, parfois nulle, alors qu'au contraire les lipides extraits par l'éther de pétrole ont une acidité beaucoup plus élevée. En effet, les acides gras libres, dans leur quasi-totalité, restent en solution dans la phase alcoolique et on les retrouve dans les lipides dissous que, pour cette raison d'ailleurs, nous avons qualifié de "lipides acides". L'on peut ainsi obtenir facilement des glycérides presque neutres qui pourraient être utilisés directement en thérapeutique sans qu'il soit nécessaire de procéder aux longues et délicates opérations de neutralisation qui entraînent toujours un abaissement notable du rendement (les "pâtes de neutralisation" entraînant en effet, au moins 50 % de lipides neutres). Ce résultat, très favorable, permet d'envisager la généralisation de cette méthode pour l'obtention d'huile de chaulmoogra neutre.

Il est, d'autre part, bien évident que les "lipides acides" ne pourront être utilisés tout au moins directement. Il y aura donc lieu de distinguer le rendement en glycérides neutres que l'on peut encore qualifier de "rendement utilisable" et le "rendement total" qui correspond à la quantité totale de lipides extraits par l'éthanol. Seul le rendement utilisable devra être envisagé lors de l'extraction des huiles destinées à l'usage thérapeutique.

Remarquons d'ores et déjà que les lipides acides ne sont pas exclusivement constitués par des acides gras libres restés en solution alcoolique mais contiennent encore, comme nous le verrons ci-dessous, d'autres composés lipidiques, en particulier des esters de nature diverse et des matières insaponifiables. En effet, l'indice d'acide théorique des acides gras en C 18 est proche de 200. Or l'indice des lipides acides ne dépasse qu'accidentellement une valeur de 100 ; d'où l'on peut déduire que la quantité d'acides gras libres dans ces lipides ne doit dépasser qu'exceptionnellement 50 %.

C - INDICE D'IODE ET DEVIATION POLARIMETRIQUE

Ces deux valeurs évoluant généralement dans le même sens, nous tenterons de les interpréter parallèlement. Une première remarque s'impose immédiatement lorsque l'on examine le tableau n° 6 : ces valeurs sont très voisines pour les lipides issus de la même espèce botanique qu'ils soient extraits par l'éthanol ou par l'éther de pétrole. Seuls les lipides acides révèlent une constitution nettement différente et méritent une étude plus attentive.

En effet, les indices d'iode de ces fractions acides sont très variables - généralement plus faibles mais parfois plus élevés que ceux des glycérides précipités. Il y a cependant compensation réciproque de sorte que l'indice moyen des lipides extraits par l'éthanol correspond sensiblement à l'Indice d'Iode des lipides extraits par l'éther de pétrole ; ce qui d'ailleurs, s'explique aisément puisque dans l'un et l'autre cas, on extrait pratiquement la totalité des lipides de la graine oléagineuse. Mais si cette compensation réciproque s'explique aisément, il est plus difficile de savoir pourquoi les lipides acides ont un indice d'iode tantôt moins, tantôt plus élevé que les glycérides neutres correspondants. Effectivement, il était logique de s'attendre à ce que ces lipides acides possèdent toujours un indice d'iode plus élevé que les glycérides neutres, d'abord en raison de leur taux élevé en acides gras (dont l'indice d'iode est toujours plus haut que celui des glycérides correspondants), ensuite parce que ces lipides acides doivent certainement contenir des glycérides riches en acides gras éthyléniques liquides, ceux-ci étant, on le sait, plus solubles que les glycérides solides dans l'éthanol froid. Or, tel n'est pas le cas ici : une observation attentive révèle, au contraire, que lorsque les glycérides neutres ont un indice d'iode bas, les lipides acides correspondants ont un indice d'iode moins élevé et, lorsque l'indice d'iode des glycérides est élevé, celui des lipides acides correspondants, l'est encore davantage. Nous ne pouvons, ici que constater le phénomène. Pour l'interpréter, il sera nécessaire de procéder à l'analyse des lipides acides et d'établir leur constitution chimique.

En ce qui concerne la déviation polarimétrique, celle des glycérides extraits par l'alcool est toujours légèrement supérieure à celle des lipides extraits par l'éther de pétrole. Elle est très peu élevée pour les "lipides acides". Mais ici il n'y a plus d'exacte compensation : la moyenne des déviations polarimétriques des lipides acides et des glycérides neutres ne correspond pas exactement à celle des huiles extraites par l'éther de pétrole. Là encore, seule l'analyse des lipides acides, que nous entreprenons maintenant, permettra d'interpréter ce phénomène.

CHAPITRE IV

ANALYSE DES GLYCÉRIDES NEUTRES ET DES LIPIDES ACIDES

A - ACIDES GRAS ET GLYCERIDES

1 - PREPARATION ET ANALYSE DES LIPIDES ACIDES -

Préparation des lipides acides

Afin de pouvoir interpréter les résultats du tableau n°6, il est maintenant nécessaire d'analyser et de comparer la constitution chimique des glycérides précipités et celle des lipides acides ; en d'autres termes, d'étudier la répartition des différents constituants des lipides totaux entre la phase lipidique précipitante et la phase alcoolique soluble.

Pour procéder à cette étude nous avons choisi les graines de Caloncoba echinata et ceci pour deux raisons. D'abord parce que les lipides restés en solution alcoolique sont relativement peu acides dans cette espèce : il y a donc tout lieu de croire que la phase alcoolique retient une proportion non négligeable des glycérides neutres ce qui constitue un des cas les plus défavorables qui puisse se rencontrer. Ensuite, parce que nous possédions une réserve suffisante de graines pour pouvoir obtenir une quantité assez importante de lipides acides.

Les graines ont été parallèlement épuisées par l'éther de pétrole et par l'éthanol bouillant. Les fractions lipidiques ont été séparées selon la technique déjà indiquée précédemment. L'extraction alcoolique a été effectuée sur une quantité de matière première suffisante pour obtenir au moins 20 g de lipides acides, soit 1500 g de graines. Les lipides acides obtenus présentaient des caractéristiques sensiblement identiques à celles figurant au tableau n°6,

soit :

- Indice d'acide = 59,8
- Indice d'iode = 97,2
- Déviation polarimétrique = 29°

On procède alors à leur analyse de la manière suivante :

Analyse des lipides acides

a) Matières insaponifiables

Sur 5 g de lipides acides, on dose les matières insaponifiables selon la méthode indiquée à la page 12. La teneur en matières insaponifiables totales ainsi déterminées s'élève à 5,3 pour 100 soit une valeur bien supérieure à celle du taux de matières insaponifiables dans les huiles courantes.

Leur déviation polarimétrique, déterminée dans les conditions habituelles, est de $\alpha_D^{20} = -14^\circ$.

b) Phosphoaminolipides

Le phosphore lipidique est dosé, après minéralisation des lipides acides, selon la méthode de Jules Carles que nous décrirons ci-dessous.

On trouve une quantité de phosphore minéral de 0,21 g pour 100 g de lipides acides. En admettant que le rapport moyen des poids moléculaires des phosphoaminolipides et du phosphore minéral est de 27 et en multipliant par cette valeur le poids de phosphore minéral, on obtiendra la teneur en phosphoaminolipides des lipides acides, soit 5,67 g%.

c) Autres composés lipidiques

Sur 10 g de produit, nous procédons alors à la séparation des autres constituants.

Les lipides acides sont neutralisés en présence de phénolphtaléine par une solution de potasse alcoolique 0,1 N à froid. Dans ces conditions, les acides libres sont neutralisés mais les glycérides ne sont pas saponifiés. Le mélange de glycérides et de savons ainsi obtenu est dilué par 4 fois son volume d'eau distillée. Les savons restent en solution, cependant que les lipides (glycérides et matières insaponifiables) surnagent. Le mélange est porté dans une ampoule à décantation et les glycérides accompagnés des matières insaponifiables sont extraits par de l'éther de pétrole. La solution étheropétrolique est lavée, séchée sur du sulfate de sodium anhydre et distillée sous pression réduite afin de recueillir les lipides neutres : on obtient 5,8 g. La solution de savons est d'autre part traitée par de l'acide chlorhydrique dilué. Les acides gras sont régénérés et viennent surnager en surface cependant que des grumeaux brun rougeâtres apparaissent, décelant la présence d'acides oxydés. Ceux-ci sont dosés selon la méthode unifiée internationale (74). Ils sont extraits par l'éthanol après que les acides gras aient été repris par l'éther de pétrole. Les solutions d'acides gras et d'acides oxydés sont alors séchées, les solvants sont éliminés par distillation dans les conditions habituelles et les résidus pesés. On obtient 1,17 g d'acides oxydés et 2,5 g d'acides gras.

Discussion des résultats

Il est étonnant de constater qu'on ne retrouve, en définitive, dans cette troisième analyse, que 9,47 g de constituants provenant de 10 g de lipides acides ; la différence correspondant approximativement aux taux de matières insaponifiables ou au taux de phosphatides. Or, ces deux constituants devaient logiquement se retrouver dans les 5,8 g de glycérides puisqu'ils ne présentent, ni l'un, ni l'autre, de fonction acide libre susceptible d'être neutralisée par la solution de potasse diluée. Afin de vérifier leur présence et de les rechercher dans les lipides neutres, nous avons procédé successivement aux deux expériences suivantes :

a) dans une première opération, nous avons dosé les matières insaponifiables dans 5 g de lipides neutres ainsi séparés ; l'analyse révèle que ces 5 g contiennent 0,46 g de matières insaponifiables. Il en résulte que les 5,8 g de lipides neutres contiennent $\frac{0,46 \times 5,8}{5}$ soit 0,53 g de matières insaponifiables, soit autrement dit la totalité des matières insaponifiables contenues dans les 10 g de lipides acides.

b) dans une seconde expérience, nous avons recherché le phosphore dans ces lipides neutres par la méthode de DELSAL et MACHEBOEUF [36]. Alors que la réaction devrait être très fortement positive, il est étonnant de constater, au contraire, une coloration bleue très pâle à peine perceptible révélant un taux très faible de phosphoaminolipides. Ceux-ci ont donc été éliminés lors du lavage pratiqué avec la solution de potasse, ce qui suppose la présence de fonctions acides libres. Cette hypothèse est confirmée par la recherche du phosphore dans la solution hydro-alcoolique contenant, sous forme de sel de potassium, les acides

gras et les acides oxydés ; recherche qui donne une réaction très fortement positive.

Il apparaît donc que les phosphoaminolipides contenus dans les lipides acides sont en grande partie hydrolysés avec mise en liberté des acides phosphatidiques. Cette hydrolyse est très vraisemblablement due à l'action prolongée de l'éthanol bouillant dans lequel, on le sait, les phosphoaminolipides ne sont pas stables. Les acides phosphatidiques résultant de cette hydrolyse, sont entraînés lors de la neutralisation sous forme de sels de potassium correspondants et restent en solution hydroalcoolique, ce qui explique le taux élevé de phosphore mis en évidence dans cette fraction. Lorsque l'on traite cette solution par un acide minéral afin de régénérer les acides gras à partir de savons, on remet également en liberté les acides phosphatidiques libres, qui restent en solution aqueuse cependant que les acides gras sont repris par de l'éther de pétrole. C'est pourquoi une recherche de phosphore effectuée sur la solution aqueuse après séparation des acides gras est très fortement positive. La perte de ces dérivés organiques phosphorés explique pourquoi nous ne retrouvons pas la totalité des constituants des 10 g de lipides acides mis en expérience. Les 5,8 g de lipides neutres obtenus ne correspondent donc pratiquement qu'aux glycérides et aux matières insaponifiables contenus dans les 10 g de lipides acides utilisés au départ et sont constitués par 0,53 g de matières insaponifiables et, par 5,8 - 0,53 g soit 5,27 g de glycérides neutres.

Ces deux constituants ne pouvant être séparés autrement que par saponification et destruction des glycérides, nous avons déterminé les caractéristiques du mélange. Elles figurent au tableau n° 7. Ces valeurs, malgré la présence des matières insaponifiables, donnent une indication suffisante sur la nature chimique des glycérides restés en solution alcoolique.

Tableau n° 7

Analyse des lipides acides de Caloncoba echinata

Nature des constituants	Etat physique	Poids pour 100 g de lipides acides	Indice d'iode	Indice d'acide	Déviati on polarimétrique
Acides gras	solides	25	85,1	193	42°20'
Acides oxydés	solides	11,7	80,2	98	-
Lipides neutres	liquides	-	104,5	0,8	36°31'
- glycérides	liquides	52,4	-	-	-
- matières insaponifiables	solides	5,3	-	-	-14°
Composés lipidiques phosphorés	solides	5,6	-	-	-

Généralisation des résultats de l'analyse

Lorsque l'on étudie ces résultats, deux phénomènes sont frappants : l'indice d'iode des acides gras est bas (85,1) alors que l'on pouvait s'attendre à un indice d'iode correspondant aux acides gras moyens, soit environ 100 ; l'indice d'iode des glycérides est très élevé et dépasse d'environ 10 l'indice des glycérides moyens.

En vue de généraliser ces résultats avant d'interpréter l'ensemble du tableau n°6, nous avons également séparé les acides gras libres et les glycérides constituants les lipides acides résultant de l'extraction par l'éthanol bouillant d'au-

tres graines de chaulmoogra. Les indices d'iode des fractions obtenues, qui figurent au tableau suivant, confirment nos premières observations.

Tableau n° 8

Indice d'iode des constituants principaux des lipides acides
de diverses graines de chaulmoogra

	Acides gras	Lipides neutres
- <i>Camptostylus Mannii</i> (Gabon)	52,8	78,2
- <i>Caloncoba Welwitschii</i> (Gabon)	76	98
- <i>Caloncoba Welwitschii</i> (Cameroun)	86	103,8
- <i>Caloncoba glauca</i> (Cameroun)	93,3	113,8

Les résultats figurant aux tableaux n° 7 et 8 permettent d'interpréter maintenant les valeurs figurant au tableau n° 6 et donnent une première indication sur la répartition des constituants des lipides totaux entre la phase lipidique et la phase alcoolique lors de l'extraction par l'éthanol, tout au moins en ce qui concerne les acides gras et les glycérides neutres.

2 - INTERPRETATION DES RESULTATS -

les glycérides

Les lipides neutres, essentiellement constitués par des glycérides et des matières insaponifiables, présentent toujours un indice d'iode beaucoup plus élevé que les glycérides spontanément précipités au sein du miscella. Ils sont donc plus riches en acide gorlique ; ce résultat ne doit pas étonner : en effet, les glycérides monogorliques sont liquides, et plus solubles dans l'éthanol froid que les glycérides solides. Cependant, le taux d'acide gorlique contenu dans les lipides acides reste très faible et correspond approximativement, pour un indice d'iode de 104,5 par exemple, à un radical gorlique pour 4 radicaux cyclopenténiques. De plus, la quantité d'acide gorlique, ainsi séparée des glycérides précipités, reste très faible, en égard de la quantité d'acide gorlique contenu dans les lipides totaux. En effet, dans le cas de *Caloncoba echinata*, précédemment étudié, la phase alcoolique ne retient en définitive qu'une fraction de glycérides correspondant seulement à 0,9 % des glycérides totaux. L'indice d'iode de cette fraction s'élevant à 104,5, celle-ci correspond environ à 0,5 % de glycérides monogorliques alors que les lipides totaux en contiennent 30 à 40 % (correspondant à un taux d'acide gorlique variant de 12 à 15 % selon les auteurs). Il apparaît donc que la plus grande partie des glycérides riches en acide gorlique (mono ou digorlide) ont précipité au sein de la phase alcoolique, et se retrouvent dans les glycérides précipités.

Le pourcentage peu élevé des lipides restés en solution incitait déjà à cette conclusion. Aussi ne peut-on espérer, comme nous l'avions pensé, mettre à profit l'action sélective de l'éthanol, pour séparer facilement les glycérides riches en acide gorlique. Il sera donc nécessaire de faire appel à d'autres méthodes pour extraire des huiles de chaulmoogra, des fractions à haut indice d'iode.

L'éthanol, s'il n'est pas un solvant sélectif efficace à l'égard des mono et digorlides, permet cependant d'obtenir des glycérides neutres, dans d'excellentes conditions et c'est pourquoi nous poursuivons l'étude de cette méthode d'extraction.

La déviation polarimétrique peu élevée de ces lipides solubles, est due à la présence de quantités importantes de matières insaponifiables dont nous avons vu qu'elles ont un pouvoir rotatoire lévogyre : mais ils contiennent sans doute aussi une petite quantité d'acide oléique, acide optiquement inactif se trouvant en faibles proportions dans les huiles de chaulmoogra et qui, plus soluble, doit également rester en partie dissout dans la phase alcoolique.

Les lipides acides auront donc un indice d'iode d'autant plus élevé qu'ils contiennent davantage de glycérides et, dans ce cas, l'indice d'iode des glycérides spontanément précipités par refroidissement de la solution alcoolique tendra à décroître. Quant à leur déviation polarimétrique, elle est d'autant plus basse que leur taux en matières insaponifiables est plus important.

Les acides gras et les acides oxydés

Ils sont caractérisés par un indice d'iode faible et toujours beaucoup moins élevé que l'indice d'iode théorique des acides gras moyens ; il n'est pas douteux qu'ils proviennent de l'hydrolyse des lipides de la graine oléagineuse, hydrolyse favorisée par des ferments (une ou plusieurs lipases) et par l'oxydation. Ces ferments semblent donc agir plus aisément sur les liaisons glycérol-acide saturé que sur les autres liaisons glycéridiques, ce qui expliquerait la richesse en acides saturés des acides gras libres. Leur pouvoir rotatoire, également bas, confirme bien cette hypothèse. Ce phénomène est évidemment avantageux : les acides retenus en solution dans l'alcool étant plus riches en acides gras linéaires saturés, on débarrasse ainsi les glycérides précipités d'une surcharge en produits inactifs. On peut étendre cette conclusion aux acides oxydés dont l'indice d'iode est naturellement plus bas encore (l'oxydation se manifestant au niveau des doubles liaisons). Ces acides oxydés étant très solubles dans l'alcool restent en solution dans la phase alcoolique. La petite proportion que l'on retrouve dans les lipides acides résulte de l'épuisement maintes fois répété du résidu de la phase alcoolique par l'éther de pétrole bouillant qui finit par entraîner une petite quantité de ces acides oxydés, solubilisés à la faveur des acides gras.

Ainsi la présence d'acides gras libres riches en acides saturés a pour conséquence d'abaisser l'indice d'iode et le pouvoir rotatoire des lipides acides et donc d'augmenter ces mêmes valeurs pour les glycérides spontanément précipités. Ils provoquent un effet rigoureusement inverse à celui produit par les glycérides restés dissous dans l'alcool.

Nous avons observé en outre que les indices des lipides acides diminuent avec le temps. Ils étaient passés respectivement, après plusieurs mois, de 98,6 à 73 et de 90,1 à 71,3. Cette chute concomitante des deux indices résulte vraisemblablement de la disparition des fonctions acides libres par oxydation au niveau des liaisons éthyléniques, puis estérification interne et cyclisation. On observe ce phénomène lors de l'auto-oxydation des acides gras éthyléniques.

Conclusions

L'ensemble de ces résultats permet de mieux interpréter les valeurs figurant au tableau n° 6.

- la déviation polarimétrique, toujours très faible, des lipides acides trouve son origine dans la superposition de plusieurs facteurs qui tous tendent à abaisser cette valeur à savoir : la richesse en acide palmitique optiquement inactif des acides gras libres, la présence d'acide oléique inactif dans les glycérides, enfin, la richesse des matières insaponifiables en stérols lévogyres qui contrarient le pouvoir rotatoire dextrogyre des composés cyclopenténiques.

- les proportions réciproques d'acides gras libres et de glycérides dans les lipides acides sont à l'origine du fait que ces lipides ont un indice d'iode tantôt plus, tantôt moins élevé que les glycérides précipités correspondants, selon que les premiers ou les seconds l'emportent. En fait, cette constatation n'est pas rigoureusement exacte : elle ne serait valable que si les différentes espèces avaient une constitution chimique rigoureusement identique ; or tel n'est pas le cas et l'on conçoit que les taux réciproques d'acide palmitique et d'acide gorlique d'une espèce donnée, auront une incidence directe sur les indices d'iode des acides gras libres et des glycérides.

Qu'une espèce soit très riche en acide gorlique et, au contraire, très pauvre en acide palmitique (c'est par exemple le cas des graines de Caloncoba glauca

du Cameroun), les acides gras libres seront, eux-mêmes, très pauvres en acides saturés et tendront à correspondre aux acides des glycérides moyens alors qu'au contraire les glycérides retenus en solution dans l'alcool seront très riches en acide gorlique et auront un indice d'iode élevé : il n'y aura plus alors compensation réciproque entre les glycérides et les acides gras libres, mais déséquilibre au profit des glycérides et, par conséquent, l'indice d'iode sera très élevé. Pour la même raison la déviation polarimétrique sera également élevée, en raison de l'absence d'acide palmitique. Ainsi se trouvent parfaitement interprétés les résultats des tableaux 6 et 8 concernant le Caloncoba glauca du Cameroun.

Par un raisonnement identique l'on démontrerait que dans les lipides acides de Camptostylus Mannii, en raison même de la richesse de cette espèce en acide palmitique, les acides gras libres sont également très riches en cet acide, alors que les glycérides ne contiennent vraisemblablement qu'un taux réduit d'acide gorlique : il n'y a plus ici, non plus, compensation des deux phénomènes, mais déséquilibre en faveur des acides gras à indice d'iode faible cette fois, de sorte que l'indice d'iode des lipides acides est beaucoup plus bas que celui des glycérides précipités. Il apparaît ainsi que l'ordre dans lequel ont été classées les espèces dans le tableau 6 (page 37) n'était nullement quelconque, mais allait, au contraire, des espèces les plus riches aux espèces les plus pauvres en acides saturés, ce qui se manifestait par une élévation constante de l'indice d'iode des glycérides précipités et surtout des lipides acides.

- Dans ce tableau enfin, l'indice d'iode des lipides acides de Caloncoba echinata peut paraître aberrant ; en effet, sa valeur est plus élevée que celle des glycérides précipités, ce qui signifie, en d'autres termes, que les glycérides l'emportent sur les acides libres. La cause doit en être recherchée dans le fait que les graines de cet échantillon sont beaucoup plus pauvres en acides gras libres que celles des autres espèces, de sorte que les acides gras, bien qu'ayant un indice d'iode peu élevé, sont en quantité trop réduite (25 à 30 % seulement, alors qu'ils sont à raison de 50 % environ dans les lipides acides des autres espèces) pour compenser les glycérides qui sont beaucoup plus abondants et par conséquent l'emportent ; de sorte que l'indice d'iode est élevé.

- En raisonnant de la même façon, l'on peut interpréter les valeurs des déviations polarimétriques des autres fractions lipidiques. Le fait que les différences entre les déviations polarimétriques des lipides extraits par l'éther de pétrole et des lipides extraits par l'éthanol vont en s'atténuant de haut en bas du tableau, s'explique par la diminution concomitante du taux d'acide palmitique dans les acides gras contenus dans les huiles extraites au moyen de l'éther de pétrole qui se trouvent ainsi défavorisées. Dans les espèces où les acides gras libres ne contiennent pratiquement plus d'acide palmitique (Caloncoba glauca du Cameroun) les valeurs se rapprochent. L'avantage reste cependant aux glycérides précipités dans l'alcool, d'une part parce que ceux-ci sont plus pauvres en acide oléique (qui est passé en partie dans les lipides acides), ensuite parce qu'ils contiennent une proportion moins élevée de matières insaponifiables levogynes (voir ci-dessous, page 48) ; la perte légère en glycérides riches en acide gorlique dont une partie est restée en solution alcoolique et se retrouve donc dans les lipides acides, n'intervient pas, cet acide ayant sensiblement la même déviation polarimétrique que les acides cyclopenténiques monoéthyléniques.

En résumé, on peut considérer que la fraction lipidique restée en solution dans la phase liquide contient la presque totalité des acides gras libres présents dans la graine oléagineuse, mais aussi des glycérides neutres en quantité très faible par rapport aux glycérides spontanément précipités au sein de la phase alcoolique. Ainsi l'éthanol, après avoir entraîné les matières lipidiques du tourteau soumis à l'extraction, permet leur séparation en deux phases, l'une soluble, l'autre précipitante. Telle est, incontestablement, la caractéristique dominante de ce solvant. Mais les proportions réciproques et la constitution chimique de ces deux phases lipidiques doivent dépendre d'un certain nombre de facteurs,

tels par exemple que la constitution des lipides totaux, les conditions de l'extraction, etc. Il nous a paru nécessaire d'étudier comment est modifiée la répartition des lipides totaux entre la phase lipidique solide et la phase alcoolique liquide, au moment du refroidissement du miscella, lorsque varient ces divers facteurs.

3 - REPARTITION DES DIVERS CONSTITUANTS DES LIPIDES TOTAUX (ACIDES GRAS ET GLYCERIDES) ENTRE LES PHASES LIQUIDE ET SOLIDE, EN FONCTION DE DIVERS FACTEURS -

Répartition en fonction de la quantité d'alcool

La fraction que nous avons qualifiée de lipides acides, correspond, en fait, aux lipides solubles dans l'alcool à froid. On pouvait donc se demander si les lipides retenus en solution alcoolique variaient de façon importante en quantité et en composition en fonction de la quantité d'alcool utilisée pour réaliser l'extraction.

Les extractions qui ont permis d'obtenir les résultats exposés au tableau n° 6 ont toutes été menées dans des conditions identiques : 500 g de graines oléagineuses broyées étaient placés dans l'extracteur alors qu'un volume de 1500 ml d'éthanol était placé dans le ballon de l'appareil.

Dans la présente expérience, nous avons monté parallèlement 4 extracteurs, contenant chacun 500 g de graines de *Caloncoba echinata* finement divisées. Les 4 ballons contiennent respectivement 750, 1000, 1500 et enfin 1750 ml d'alcool. L'extraction est menée dans les conditions habituelles. Lorsque le tourteau est totalement épuisé, les miscella des 4 ballons sont ramenés par addition d'alcool bouillant à leur volume primitif, ceci afin de compenser les légères quantités de solvant toujours retenues par le tourteau après épuisement. On abandonne ensuite au refroidissement et l'on sépare, par la méthode indiquée plus haut, les glycérides précipités et les "lipides acides" de chaque ballon. Enfin l'on étudie comparativement le poids, l'indice d'acide et l'indice d'iode de chaque fraction. Le résultat de ces analyses figure au tableau n° 9.

Tableau n° 9

Répartition des lipides en fonction de la quantité d'alcool

Caloncoba echinata 500 g	Glycérides précipités			lipides acides		
	Poids obtenu	Indice d'iode	Indice d'acide	Poids obtenu	Indice d'iode	Indice d'acide
750 ml alcool	231,5 g	96	1,2	7 g	92,1	57,7
1000 ml alcool	231 g	95,8	0,8	7,5 g	95	58,3
1500 ml alcool	230 g	95,4	0,6	8,5 g	98,2	60,1
1750 ml alcool	230 g	95,1	0,4	8,5 g	100,3	60,9

Il nous est permis de tirer de cette expérience les conclusions suivantes :

- la répartition quantitative des lipides totaux entre les phases liquides et solides ne varie que dans des proportions négligeables ; le taux de lipides restés en solution dans l'éthanol froid n'augmente que très légèrement en fonction du volume de solvant utilisé.

- les glycérides précipités sont d'autant plus acides que la quantité de solvant utilisée est plus faible. Aussi se débarrasse-t-on d'autant mieux des acides gras que le volume d'alcool employé est plus important.

- l'indice d'iode des lipides acides augmente régulièrement en fonction du volume d'alcool, cependant que celui des glycérides précipités varie en sens inverse, à vrai dire, dans des proportions très faibles. On retiendra donc d'autant plus de glycérides riches en acide gras que le volume d'alcool est plus grand.

En fait, les variations qualitatives et quantitatives des glycérides précipités, seules susceptibles de nous intéresser, puisqu'ils sont seuls destinés à l'usage thérapeutique, sont si faibles que l'on peut les considérer comme pratiquement négligeables. De sorte que le critère devant guider le choix de la quantité de solvant à utiliser, est plus économique que chimique. En vue de ménager un solvant relativement coûteux et d'éviter une trop grande perte de calories lors de la rectification d'un volume important de liquide, il nous paraît souhaitable d'utiliser lors de l'extraction des graines de chaulmoogra par l'éthanol des quantités d'alcool aussi faibles que possible (dans cette expérience, 750 ml).

Répartition en fonction du temps d'extraction

Nous avons procédé successivement à deux épuisements par l'alcool de 500 g de graines oléagineuses broyées. La première extraction a duré 20 heures, temps correspondant à un épuisement pratiquement total de la matière première. La seconde extraction a été interrompue après 10 heures et nous avons comparé les caractères analytiques des "lipides acides" résultant de ces deux opérations. Les résultats figurent au tableau n° 10.

Tableau n° 10

Temps d'extraction	Etat physique	Indice d'acide	Indice d'iode
10 heures	solide	105	58
20 heures	semi-fluide	90,1	98,6

On constate que les lipides acides, résultant d'une extraction durant un temps bref, sont très riches en acides gras. Si l'on prolonge l'extraction, le taux de glycérides retenus par la phase alcoolique augmente, ce qui se manifeste par une chute de l'indice d'acide, et par une montée de l'indice d'iode.

En outre ce tableau apporte une preuve supplémentaire de la richesse des acides gras en acides linéaires saturés. En effet, les lipides acides résultant d'une extraction durant un temps bref et qui donc sont riches en acides gras, sont solides et leur indice d'iode est très bas. Puis, lorsque le taux des lipides acides en glycérides, augmente, l'indice d'iode augmente aussi, et la masse tend à devenir fluide.

Répartition en fonction de l'acidité libre des lipides de la graine oléagineuse

Une étude attentive du tableau n° 6 (page 37) révèle que la quantité de "lipides acides" obtenue est sensiblement proportionnelle à l'acidité libre de la graine oléagineuse, c'est-à-dire, à l'indice d'acide des lipides extraits par l'éther de pétrole. Ceci n'a rien d'étonnant puisque l'on sait que les lipides acides contiennent la quasi totalité des acides gras libres. Et cependant, quelle que soit la teneur en acides gras, leur indice d'acide ne dépasse qu'exceptionnellement 100, et se situe dans la plupart des cas, entre 80 et 100, ce qui correspond approximativement à une teneur en acides gras de 50 % environ. Il en résulte donc que, quelle que soit la teneur en acides gras, la phase alcoolique retient une quantité proportionnelle de glycérides. Ce phénomène est particulièrement sensible dans l'expérience suivante.

Un échantillon de *Caloncoba Welwitschii* du Gabon que nous savions particulièrement riche en acides gras libres, est épuisé par l'éther de pétrole et par

l'alcool. (Il s'agit de graines minuscules probablement récoltées bien avant leur maturité, et dont la teneur en lipides est très faible). Le tableau n° 11 permet de comparer les caractères des différentes fractions obtenues.

Tableau n° 11

Nature des fractions lipidiques	Rendement p. 100	Indice d'acide	Indice d'iode
Lipides extraits par l'éther de pétrole	28,3	42,1	97,3
Lipides extraits par l'éthanol			
- Glycérides précipités	17	2	97,5
- "Lipides acides"	11,1	96,4	96,2

On voit que, malgré la très grande acidité des lipides totaux extraits par l'éther de pétrole, les lipides acides ne contiennent que 50 % d'acides libres environ, et retiennent par conséquent également 50 % de glycérides. Il faut donc déplorer une forte perte en produit neutre et actif.

Ce phénomène peut s'expliquer par les solubilités réciproques des acides gras et des glycérides dans l'alcool. Les glycérides sont presque totalement insolubles dans l'alcool froid, alors que les acides gras y sont au contraire très solubles. De sorte que l'alcool, au fur et à mesure, qu'il s'enrichit en acides gras devient une phase solvante de plus en plus efficace pour les glycérides qui, en quelque sorte, sont solubilisés à la faveur des acides gras. De sorte que la proportion de glycérides neutres retenus en solution dans l'alcool est directement proportionnelle à la teneur de ce même alcool en acides gras libres.

Nous avons jusqu'ici attaché toute notre attention au sort des glycérides et des acides gras libres, élucidant le problème de leur répartition après refroidissement du miscella entre la phase alcoolique liquide et la phase lipidique solide. Pour avoir une vue d'ensemble sur l'extraction par l'éthanol bouillant des graines de *Chaulmoogra* africaines, il était encore nécessaire d'étudier le comportement des autres constituants des lipides, à savoir les matières insaponifiables et les phosphoaminolipides, et leur sort au cours de l'extraction alcoolique, puis de la séparation du miscella en deux phases. Nous aurons ensuite une vue d'ensemble qui nous permettra d'établir un bilan qualitatif et quantitatif de l'extraction alcoolique.

B - MATIERES INSAPONIFIABLES ET PHOSPHOAMINOLIPIDES

1 - REPARTITION DES MATIERES INSAPONIFIABLES ENTRE LES DEUX PHASES RESULTANT DE L'EXTRACTION ALCOOLIQUE -

L'analyse des lipides acides (tableau n° 7) ayant révélé une teneur très élevée en matières insaponifiables, l'on pouvait s'attendre à ce que les glycérides précipités au sein du miscella soient plus pauvres en matières insaponifiables que les lipides totaux, résultant d'une extraction par l'éther de pétrole. Cette hypothèse se trouve confirmée par les dosages de matières insaponifiables effectués sur les lipides de deux espèces de *Caloncoba*. En utilisant la méthode indiquée dans la première partie de ce travail, c'est-à-dire en épuisant successivement la solution savonneuse par de l'éther de pétrole (E. P.) et par de l'éther sulfurique (E. S.) nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau n° 12

Matières insaponifiables contenues dans 100 g de lipides

Espèces étudiées	Caloncoba Welwitschii				Caloncoba echinata			
Solvant utilisé pour l'extraction de l'huile	Alcool		éther de pétrole		Alcool		éther de pétrole	
Matières insaponifiables extraites par	E.P.	E.S.	E.P.	E.S.	E.P.	E.S.	E.P.	E.S.
Teneur en matières insaponifiables des fractions	0,52	0,20	0,63	0,18	0,54	0,06	0,71	0,07
Matières insaponifiables totales	0,72		0,86		0,60		0,78	

Les glycérides précipités au sein de la phase alcoolique sont effectivement moins riches en matières insaponifiables que les lipides extraits au moyen de l'éther de pétrole. Ce phénomène semble d'ailleurs tout-à-fait général : il a été vérifié notamment par KHALIL KANGHY [63] lors de l'extraction des huiles de lin par l'éthanol et plus récemment, au laboratoire, par S. HEINRICH⁽¹⁾ sur des huiles d'arachide extraites également par l'alcool. La différence se retrouve dans les lipides acides, ceci pouvant aisément être vérifié grâce aux valeurs figurant aux tableaux 7 et 12 et concernant Caloncoba echinata.

A partir de 500 g de graines de Caloncoba echinata soumis à l'extraction, 230 g de glycérides précipités et 8 g de lipides acides ont été obtenus. On connaît le taux de matières insaponifiables dans l'une et l'autre fraction (tableaux n° 7 et 12) soit respectivement 0,6 % et 5,3 %. Nous déterminons aisément la quantité totale de matières insaponifiables contenue dans les lipides extraits, soit :

- pour les lipides acides $0,053 \times 8 = 0,424 \text{ g}$
- pour les glycérides précipités : $0,006 \times 230 = 1,380 \text{ g}$

et au total, matières insaponifiables pour 238 g : $1,804 \text{ g}$

D'autre part, 238 g de lipides extraits par l'éther de pétrole contiennent $0,0078 \times 238 = 1,856 \text{ g}$.

La quantité globale de matières insaponifiables extraites est donc sensiblement la même. Mais, lors de l'extraction par l'alcool, la phase alcoolique retient en solution une proportion d'environ 20 à 25 % de matières insaponifiables, lesquelles se retrouvent dans l'huile acide. Bien entendu les glycérides précipités s'en trouvent appauvris d'autant.

Pour Caloncoba Welwitschii du Gabon la répartition des matières insaponifiables entre les glycérides précipités et les lipides acides est sensiblement identique à celle constatée pour Caloncoba echinata. Mais les lipides de cette espèce sont légèrement plus riches en matières insaponifiables.

Les matières insaponifiables des huiles antilépreuses possèdent-elles une activité thérapeutique ? Ce problème n'est pas encore parfaitement résolu et a

(1) Communication personnelle.

fait l'objet de plusieurs travaux dont les résultats sont apparemment contradictoires. STEVENEL [116] attribue l'activité thérapeutique des médicaments chaulmoogriques à un principe toxique, contenu dans le tégument de la graine, soluble dans l'huile, et que l'on retrouverait dans les matières insaponifiables. Mais l'auteur ne donne aucune indication sur la constitution chimique de ce principe actif qu'il qualifie de "lipoïde" en raison de sa présence dans les matières insaponifiables. Par contre, les travaux plus récents de J. TISSEUIL et P. RIVOALLEN [119] et de LE QUEREC [104] semblent infirmer catégoriquement cette hypothèse. Ayant longuement expérimenté l'activité pharmacologique des matières insaponifiables du "Gorli" et du "Krabao" indochinois, ces auteurs n'ont pu obtenir aucun résultat positif et concluent à l'inefficacité de ces produits. Les doses utilisées étaient, il est vrai, extrêmement faibles (solution de 0,01 à 0,02 g de matières insaponifiables dans l'huile d'olive). Nous ne prendrons pas partie dans ce débat, ne possédant pas suffisamment d'éléments d'appréciation. Néanmoins, l'activité léprolytique des huiles de chaulmoogra est généralement attribuée aujourd'hui par la très grande majorité des auteurs, aux acides gras cyclopenténiques qu'ils contiennent et cette thèse, à la vérité, semble fondée puisque des résultats satisfaisants ont pu être obtenus à maintes reprises avec des dérivés d'acides gras purifiés et débarrassés de toute substance susceptible de fausser l'interprétation des résultats cliniques. Dans cette perspective, les glycérides obtenus par extraction au moyen de l'éthanol étant partiellement débarrassés des matières insaponifiables et des acides linéaires inactifs, doivent avoir une activité thérapeutique supérieure aux lipides totaux obtenus au moyen de l'éther de pétrole. Nouvel avantage de l'utilisation de ce solvant.

2 - ETUDE DES PIGMENTS -

Aucune étude n'ayant été effectuée, à notre connaissance, sur les pigments contenus dans les matières insaponifiables des huiles de Flacourtiacées africaines, il était nécessaire d'en entreprendre brièvement l'analyse.

Les huiles étudiées au cours de ce travail présentaient des colorations très variables. Tandis que les lipides de Gorli étaient très peu colorés, les lipides provenant des graines de Caloncoba Welwitschii du Gabon présentaient toujours une très forte pigmentation jaune d'or. Les colorations des autres échantillons se situent entre ces deux limites, allant du blanc crème au jaune clair.

Ce sont évidemment les lipides très colorés de Caloncoba Welwitschii du Gabon qui ont tout d'abord retenu notre attention. C'est pourquoi les matières insaponifiables en ont été extraites, et les résultats obtenus figurent au tableau n° 11. La méthode employée, fondée sur l'emploi successif de deux solvants d'extraction, l'éther de pétrole tout d'abord, puis l'éther sulfurique, a permis une première constatation : la solution hydroalcoolique de savons ne cède pas la totalité de ses pigments à l'éther de pétrole que l'on utilise pour extraire les matières insaponifiables. En effet, alors que le troisième épuisement effectué avec ce solvant laissait ce dernier pratiquement incolore, la solution savonneuse cédait ensuite à l'éther sulfurique une nouvelle et très importante quantité de pigments jaunes. Il apparaissait ainsi que les huiles étudiées contiennent selon toute probabilité un mélange de plusieurs pigments.

L'étude de ces pigments n'a cependant pas été poursuivie sur les matières insaponifiables ainsi extraites. En effet, en raison du mode opératoire utilisé, l'on pouvait craindre une altération des principes colorants. On connaît, en effet, la grande sensibilité à l'oxydation des caroténoïdes et la facilité avec laquelle ils peuvent s'isomériser [127]. Aussi convenait-il d'éviter l'action d'une ébullition prolongée en milieu alcalin. C'est pourquoi l'étude spectrographique des pigments a été effectuée d'une part sur les lipides eux-mêmes, d'autre part sur les matières insaponifiables extraites après saponification à température modérée.

Nous avons établi, en utilisant le spectrophotomètre de JOBIN et YVON, la courbe d'absorption dans le domaine visible, d'une solution dans l'hexane d'huile

de Caloncoba Welwitschii du Gabon. En portant en abscisse la longueur d'onde λ en $m\mu$, et en ordonnée, la densité optique, l'on obtient une courbe (fig. A) présentant une très forte absorption dans le jaune et deux sommets caractéristiques à 640 et 680 $m\mu$. Cependant, l'interprétation de cette courbe reste difficile : elle présente l'allure classique des caroténoïdes mais les sommets assez "étalés" dans le jaune, ne permettent pas la mise en évidence certaine d'un pigment caractéristique, et laisse supposer au contraire la présence de plusieurs pigments, ayant des spectres d'absorption assez voisins. Par contre, les clochers caractéristiques mais peu élevés, à 640 et 680 $m\mu$ laissent présager la présence des chlorophylles α et β .

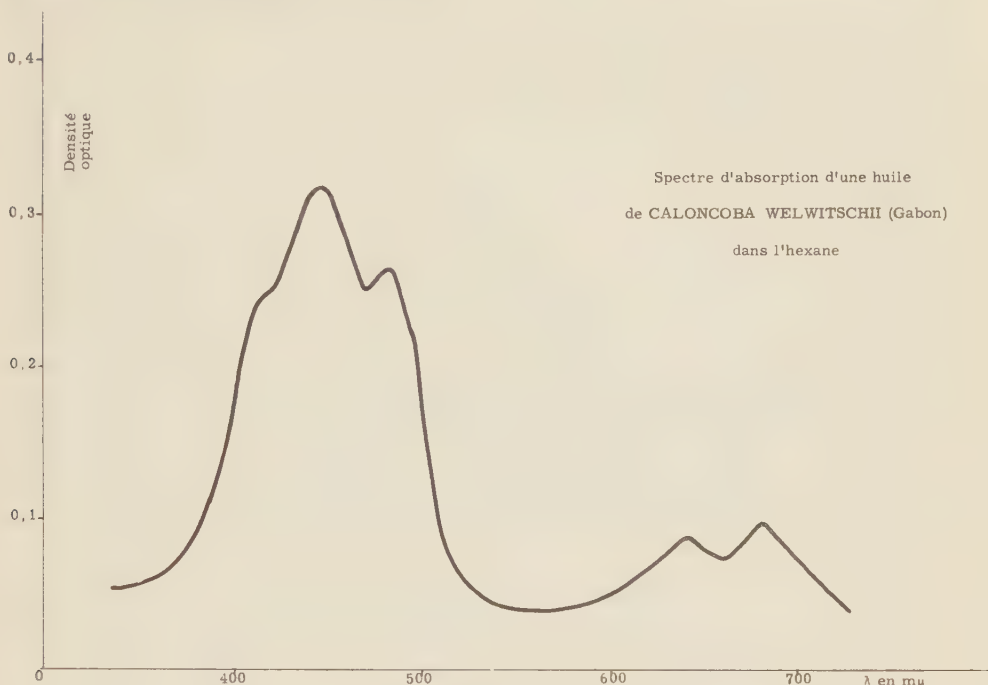


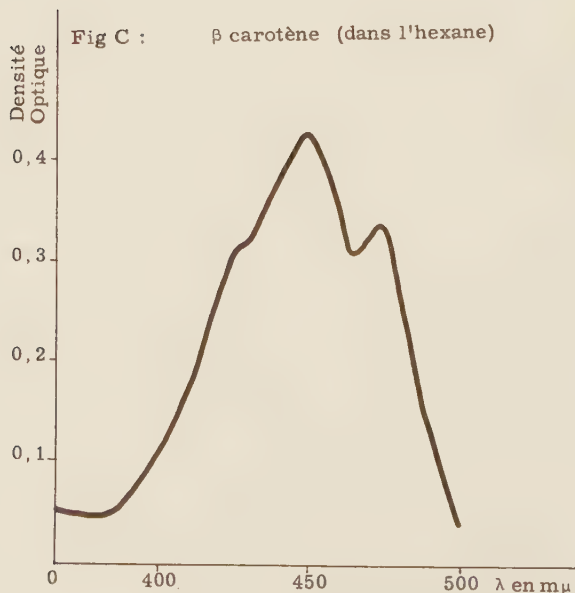
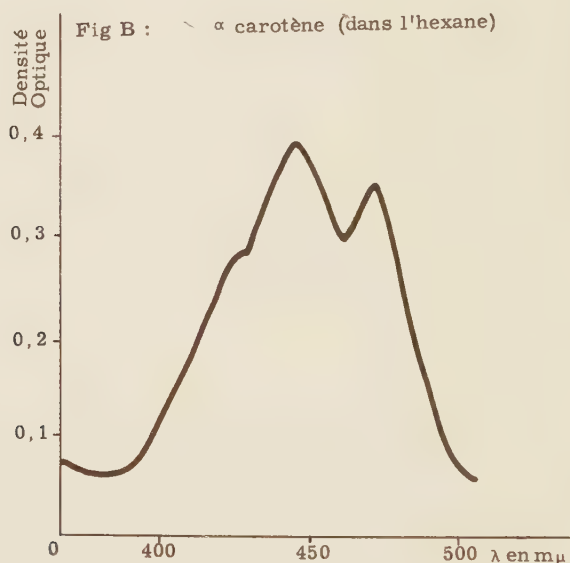
Fig. A

Pour obtenir toutefois des renseignements plus précis quant à la constitution chimique de ce mélange de pigments, les matières insaponifiables ont à nouveau été extraites, mais cette fois selon un mode opératoire particulier et moins brutal. Les lipides ont été saponifiés par de la potasse alcoolique, au bain-marie, à 65°C. Les matières insaponifiables ont ensuite été extraites successivement par les deux solvants usuels (éther de pétrole puis éther sulfurique) selon la méthode déjà indiquée de sorte que les pigments ont été ainsi séparés en deux fractions (6) selon la méthode dite de "partage entre solvants", couramment utilisée dans l'étude des caroténoïdes.

L'éther de pétrole dissout en effet les caroténoïdes hydrocarbures (α , β , γ carotènes, lycopènes et leurs stéréoisomères) que l'on désigne, en raison de leur solubilité dans le solvant le plus léger, sous le nom de "pigments épiphasiques". Les pigments polyhydroxylés (xanthophylles, etc.) au contraire restent dissous dans la solution alcoolique de savon et pour cette raison on les qualifie de "pigments hypophasiques". Enfin, les caroténoïdes monohydroxylés, en raison de leur solubilité presque identique dans les deux solvants, se partagent à peu près à part égale entre les deux phases (tel est par exemple le cas de la cryptoxanthine). Les chlorophylles sont beaucoup plus solubles dans l'éther sulfurique, suivront donc le sort des xanthophylles et pourront de ce fait être retrouvées dans les pigments "hypophasiques". Lorsque, dans une deuxième opération, l'on épuise la solution savonneuse par l'éther sulfurique, les pigments polyhydroxylés (xanthophylles) ainsi que les chlorophylles passent en solution étherée.

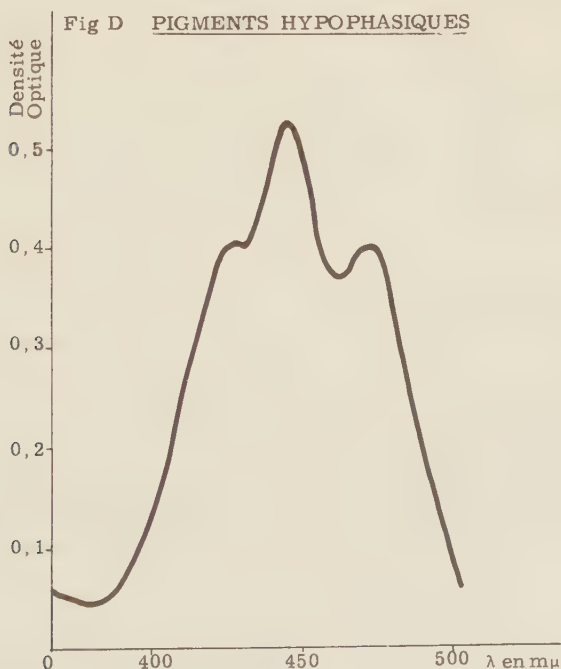
Nous avons pratiqué ce traitement et obtenu en définitive deux solutions, qui sont ensuite lavées par de l'eau distillée, séchées sur sulfate de sodium anhydre, et ramenées à volume égal. A ce stade, une première constatation s'impose. La solution éthéro-sulfurique apparaît comme étant la plus colorée, et donc sans doute la plus riche en pigments.

La solution éthéro-pétrolique des pigments épiphasiques a été chromatographiée sur colonne. Parmi les différents absorbants couramment utilisés, nous avons choisi l'alumine standard BROCKMANN, préconisée par KUHN, BROCKMANN et LEDERER [65 et 66] et la magnésie de STRAIN [117]. Le chroma-



togramme révèle de bas en haut les zones suivantes : à la partie inférieure de la colonne, un anneau étroit, jaune clair I, puis, immédiatement au-dessus, un anneau orangé II. On observe ensuite un très mince anneau, également orangé, III et enfin à la partie supérieure, à peine adsorbée, une zone très colorée brun-rouge et très étroite IV. La colonne a été éluée par un mélange contenant 95 % d'éther de pétrole, et 5 % d'éther sulfurique. La première fraction de l'éluat a été séparée pour la mise en évidence du phytoène et du phytofluène, recherche qui s'est révélée négative à l'étude spectrale. Les deux pigments les moins facilement adsorbés et retenus à la partie inférieure de la colonne sont aisément solubilisés et caractérisés par leur spectre d'absorption en solution dans l'hexane, comme étant de α carotène (fig. B) et du β carotène (fig. C). L'anneau n° III par contre, n'a pu être caractérisé à coup sûr : par analogie avec la constitution des pigments de l'huile de palme, étudiés par différents auteurs, notamment par ARGOUD [6], nous pensions qu'il correspondrait au lycopène. Cependant le spectre obtenu n'est nullement superposable à celui de ce caroténoïde, et nous n'obtenons pas les sommets caractéristiques à 472 et 504 m μ . La courbe d'absorption est atypique, et nous n'avons pu y mettre en évidence aucun sommet caractéristique. De plus l'absence certaine de phytoène et de phytofluène, composés incolores très faiblement absorbés immédiatement au-dessous de l' α carotène et que PORTER et LINCOLN [99] considèrent comme des précurseurs du lycopène tend également à prouver l'absence de ce pigment dans le mélange. Pour éluer l'anneau IV, nous avons utilisé l'éther sulfurique pur. Repris ensuite par l'éther de pétrole, ce pigment présente le spectre caractéristique de la xanthophylle (absorption maxima à 447,5 et 477,5 m μ dans ce solvant). Il s'agit ici de traces de xanthophylles entraînées en solution par l'éther de pétrole, la plus grosse fraction de ce caroténoïde étant passée dans l'éther sulfurique, et se retrouvant, nous le verrons, dans les pigments hypophasiques.

En ce qui concerne les pigments hypophasiques, nous nous sommes contentés de dresser leur courbe d'absorption dans l'éther de pétrole (fig. D). La



courbe obtenue présente les sommets caractéristiques de la xanthophylle. Si la présence de ce pigment est hors de doute, il est probable qu'il est accompagné par de faibles quantités d'autres caroténoïdes hydroxylés ; en effet, les sommets de la courbe sont plus étalés et les clochers moins caractéristiques que ceux des courbes établies avec de la xanthophylle pure.

Nous avons donc pu caractériser très certainement les carotènes α et β , la xanthophylle, les deux chlorophylles et noter l'absence de lycopène et de ses pré-curseurs incolores.

La quantité de β carotène nous a paru relativement faible. Afin de comparer les taux de carotène de l'huile de Caloncoba du Gabon aux taux moyens des huiles de palme, nous avons fait un dosage colorimétrique de ce pigment en déterminant l'absorption à 450 m μ et la rapportant au coefficient du β carotène selon la technique indiquée par CUVIER [34]. Le taux obtenu est de 0,01 % de β carotène dans l'huile, soit une valeur approximativement 10 fois plus faible que celle des huiles de palme moyennes.

3 - LES PHOSPHOAMINOLIPIDES -

Enfin, pour mener à son terme l'étude comparative de la constitution chimique des lipides extraits par les deux solvants : éthanol et éther de pétrole, il était encore nécessaire d'étudier le comportement des lipides phosphorés, et leur répartition entre les deux phases liquide et précipitée.

Le phosphore lipidique a été dosé par la méthode de Jules CARLES [25], méthode colorimétrique fondée sur l'apparition d'une coloration bleue stable par réduction de l'acide phosphomolybdique. On détermine ainsi la valeur en phosphore des deux phases lipidiques résultant de l'extraction des graines de Caloncoba echinata par l'éthanol, et des lipides totaux extraits par l'éther de pétrole, et l'on exprime ces valeurs en phosphoaminolipides en multipliant par 27 comme nous l'avons déjà vu. Les résultats obtenus figurent au tableau n° 13.

Tableau n° 13

Teneur en phosphoaminolipides des fractions lipidiques
(en g pour 100)

Résultats exprimés en	Lipides extraits par l'éther de pétrole	Lipides extraits par l'alcool	
		Glycérides précipités	Lipides acides
Phosphore	0,0141	0,0068	0,21
Phosphoamino- lipides	0,3815	0,1836	5,67

L'étude de ces résultats permet les conclusions suivantes :

a) les glycérides précipités au sein du miscella alcoolique sont beaucoup moins riches en phosphoaminolipides que les lipides totaux extraits par l'éther de pétrole (en effet, une quantité très importante de lipides phosphorés restent en solution dans l'alcool et se retrouvent ensuite dans les lipides acides).

Un calcul identique à celui effectué précédemment pour les matières insaponifiables, permet de déterminer la quantité totale de phosphoaminolipides extraits par l'un et l'autre solvant : les analyses ont été effectuées sur les échantillons qui avaient déjà servi à doser les matières insaponifiables : 500 g de graines de Caloncoba echinata ont fourni 230 g de glycérides précipités et 8 g de li-

pides acides. Connaissant le taux de phosphoaminolipides dans l'une et l'autre fraction (tableau n° 13), il est facile de calculer la quantité totale extraite, soit :

- pour les lipides acides : $8 \text{ g} \times 0,0567 = 0,4536$

- pour les glycérides neutres : $230 \text{ g} \times 0,001836 = 0,4222$

et au total, pour 238 g de lipides 0,8758 g

de phosphoaminolipides

D'autre part, 238 g de lipides extraits par l'éther de pétrole contiennent : $238 \text{ g} \times 0,003815$ soit 0,9079 g de phosphoaminolipides. La quantité totale de phosphoaminolipides extraits est donc sensiblement identique.

Mais tandis que la totalité des lipides phosphorés se retrouve dans la graisse extraite par l'éther de pétrole, une fraction très importante de ces produits reste dissoute dans l'alcool, lorsqu'on pratique l'extraction par ce solvant. Les glycérides précipitant au sein de la phase alcoolique contiennent de ce fait un taux au moins deux fois moindre en phosphoaminolipides.

Avant de tirer de ces renseignements des conclusions définitives, il est nécessaire de faire ici deux remarques.

- la phase alcoolique délipidée, résultant de l'épuisement par l'éther de pétrole du résidu de la phase alcoolique primitive, contient, comme nous le verrons ci-dessous, des quantités appréciables de phosphore. Ce phosphore, organique et minéral, ne saurait toutefois être attribué à des phosphoaminolipides puisque ceux-ci sont éliminés lors de l'épuisement par l'éther de pétrole.

- le phosphore contenu dans les lipides acides ne correspond pas seulement, comme nous l'avons vu, à des phosphoaminolipides, mais aussi à des acides phosphatidiques résultant de l'hydrolyse de ces derniers avec élimination de l'alcool aminé correspondant. Néanmoins, ces corps sont solubles dans l'éther de pétrole en raison de leurs radicaux acides gras, et font donc partie du groupe des lipides phosphorés liposolubles. De plus, ils correspondent aux phosphoaminolipides primitifs de la graine oléagineuse, et n'ont subi l'hydrolyse qu'au cours de l'extraction alcoolique. On peut donc les assimiler à ces derniers constituants.

L'on aboutit à des conclusions très similaires à celles qui ont été précédemment tirées, de l'étude de la répartition des matières insaponifiables entre les différentes phases lipidiques : les glycérides précipités au sein du miscella sont plus purs que les lipides extraits par l'éther de pétrole ; en effet, ils ont été débarrassés comme nous l'avons vu, de 25 % de matières insaponifiables, et de plus de 50 % de phosphoaminolipides au profit de la phase alcoolique liquide.

b) Les lipides de Caloncoba echinata contiennent moins de phospholipides que la plupart des huiles ; cette constatation doit être rapprochée d'une observation plus générale et selon laquelle les lipides concrets sont toujours plus pauvres en phosphoaminolipides que les lipides fluides (exemple : huile de palme).

c) Les résultats figurant ici sont susceptibles d'être généralisés, comme l'a montré, dans un travail récent effectué au laboratoire, S. HEINRICH [55]. En effet, lors de l'extraction d'une matière oléagineuse par l'éthanol, la répartition du phosphore entre les glycérides spontanément précipités et les lipides restant dissous en phase alcoolique se fait généralement dans des proportions voisines de celles qui figurent au tableau n° 13. Quant aux lipides extraits par l'éther de pétrole, ils sont toujours beaucoup plus riches en composés phosphorés.

Il n'est pas inutile d'établir maintenant un bilan définitif et de résumer brièvement l'ensemble des conclusions auxquelles nous avons abouti au cours de cette étude.

En utilisant le mode opératoire indiqué au chapitre II, il est possible d'extraire la presque totalité des lipides contenus dans la matière première oléagineuse, que le solvant employé soit l'éthanol ou l'éther de pétrole. L'éther de pétrole permet l'obtention directe des lipides totaux par simple distillation du miscella homogène et limpide obtenu. Par contre l'alcool, après refroidissement du miscella, entraîne la séparation des lipides totaux en deux fractions dont l'une précipite et l'autre reste en solution. La fraction insoluble est constituée par des glycérides assez purs, très pauvres en acides gras libres, et partiellement débarrassés des matières insaponifiables et des phosphoaminolipides. Ces composés se retrouvent dans la fraction lipidique restée en solution : celle-ci contient de ce fait la quasi-totalité des acides gras libres, la moitié environ des phosphoaminolipides, une fraction non négligeable des matières insaponifiables, des acides oxydés en proportion généralement assez faible, enfin une fraction des glycérides liquides, d'autant plus solubles dans l'éthanol que le taux d'acides gras libres et le volume solvant employé sont plus élevés. Cette perte en glycérides est évidemment fâcheuse. Remarquons cependant qu'elle est pratiquement négligeable pour des graines d'acidité moyenne puisqu'en aucun cas, elle ne dépasse 1,5 à 2 %.

L'emploi de l'éthanol permet donc d'obtenir directement des glycérides beaucoup plus purs que si on pratique l'extraction par les autres solvants des lipides. D'autre part, il retient en solution préférentiellement certains de leurs constituants. Il serait donc particulièrement utile de savoir si l'action dissolvante de l'éthanol ne s'exerce pas aussi préférentiellement sur certains types de glycérides, autrement dit, d'explorer les possibilités d'obtenir lors du refroidissement du miscella une cristallisation fractionnée des glycérides. Nous avons observé en effet, que la phase lipidique, c'est-à-dire les glycérides précipités, était en partie constituée par des cristaux, lesquels restaient plus ou moins en suspension dans la phase alcoolique. Quelle est la nature glycéridique de ces cristaux ? Ont-ils une constitution chimique différente de celle des glycérides amorphes ? Cette cristallisation fractionnée et spontanée dans l'alcool permet-elle d'éliminer des glycérides moins actifs ? Telles sont les questions que l'on peut maintenant se poser et auxquelles nous allons tenter de répondre.

D'autre part, pour que l'usage de l'éthanol puisse être envisagé dans la pratique courante, il convient de déterminer également ses qualités économiques. En effet, un bon solvant doit être capable d'épuiser dans un temps relativement bref la matière première oléagineuse, afin de limiter au maximum la consommation en calories. Il est donc nécessaire d'envisager, dans une deuxième partie de cette étude de l'extraction des graines de *Caloncoba* par l'alcool, la cinétique de l'extraction, c'est-à-dire d'établir la courbe donnant les quantités de lipides extraits en fonction du temps.

CHAPITRE V

ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'EXTRACTION

ET DE LA CRISTALLISATION SPONTANÉE DES GLYCÉRIDES DANS L'ALCOOL

A - EXTRACTION DE CALONCOBA WELWITSCHII

1 - MODE OPERATOIRE UTILISE -

Afin de déterminer à la fois la vitesse de l'extraction et l'éventuel bénéfice que l'on pourrait tirer d'une cristallisation fractionnée des glycérides dans le miscella abandonné au refroidissement, nous avons imaginé une expérience qui nous permettrait de résoudre ce double problème. Des graines de Caloncoba Welwitschii, originaires du Gabon, ont été utilisées car le laboratoire en possédait un stock assez important au moment où nous entreprenions cette étude. A cette époque en effet, les graines de Gorli ne nous étaient pas encore parvenues; aussi l'étude cinétique de l'extraction des graines de cette dernière espèce n'a été effectuée qu'ultérieurement.

Le mode opératoire suivant a été utilisé : 600 g de graines de Caloncoba Welwitschii sont finement broyées, puis placées dans l'extracteur. On introduit un litre d'éthanol à 96° 5 dans le ballon. L'appareil est chauffé pour obtenir l'ébullition de l'alcool. Après une heure exactement, nous remplaçons ce premier ballon par un second, contenant également un litre d'alcool bouillant, de façon à ne pas interrompre l'extraction. Nous répétons cette opération d'heure en heure pendant dix heures, puis toutes les deux heures durant encore dix heures. Nous obtenons finalement 15 ballons numérotés de 1 à 15. Enfin, un seizième ballon sera laissé, durant plusieurs heures, jusqu'à épuisement total du tourteau.

Chaque fraction ainsi obtenue est abandonnée pendant 24 heures au repos, à la température du laboratoire, voisine de 20°C. Après ce temps, chaque ballon offre un aspect identique : une fraction lipidique solide s'est séparée de la phase alcoolique limpide, et se présente sous deux aspects : au fond du ballon, une "masse amorphe" jaune, constituant un beurre homogène et dense ; sur les bords et au sein de la solution mère, des cristaux sous forme d'aiguilles en rosette, légers, très élégants évoquant des cristaux de neige : l'excès de solvant retenu par ces fractions est éliminé dans les conditions habituelles et nous obtenons ainsi 32 fractions, dont chacune est exactement pesée et sera étudiée. Puis chaque ballon est placé dans le réfrigérateur pendant 24 heures à -5°C. Après ce temps, la solution mère, primitivement limpide a donné naissance à une deuxième série de cristaux que nous récoltons et que nous traitons comme ci-dessus (il n'y a plus de masse amorphe). Enfin les solutions mères sont distillées sous un courant de gaz inerte et sous pression réduite. Nous obtenons ainsi le résidu de chaque fraction. Ces résidus sont épuisés par l'éther de pétrole bouillant, les solutions extractives sont à leur tour distillées, et nous obtenons de nouveau 16 fractions lipidiques; leur odeur est forte, leur couleur foncée et elles demeurent liquides à l'exception des deux premières qui sont solides.

2 - VITESSE ET RENDEMENT DE L'EXTRACTION -

Nous indiquons dans le tableau n° 14, le poids de chacune des fractions, ainsi que la quantité totale des lipides extraits en fonction de la durée de l'extraction.

Tableau n° 14

Extraction fractionnée des graines de Caloncoba Welwitschii Poids des fractions

Durée de l'extraction	Lipides précipités			Lipides acides solubles	Quantités totales des lipides extraits par heure	Quantités de "lipides précipités" (I+II+III) obtenus en fonction du temps d'extraction (courbe I)	Quantités totales de lipides extraits en fonction du temps d'extraction (courbe II)
	I amorphe	II 1ère série de cristaux	III 2ème série de cristaux				
1 Heure	71,400	1,700	2,100	8,800	83,800	75,200	83,800
2 "	19,300	1,900	1,600	4,000	26,800	97,800	110,600
3 "	12,400	1,600	1,500	3,700	19,200	113,300	129,800
4 "	12,100	1,200	1,800	2,600	17,700	128,400	147,500
5 "	9,700	1,300	1,200	2,300	14,500	140,600	162,000
6 "	8,500	1,100	1,000	1,200	11,800	151,200	173,800
7 "	6,700	0,800	0,800	0,700	9,000	159,500	182,800
8 "	6,200	0,600	0,700	0,600	8,100	167,000	190,900
9 "	5,600	0,900	0,900	0,800	8,000	174,200	198,900
10 "	5,500	0,700	0,800	0,600	7,600	181,200	206,500
12 "	10,300	1,400	0,900	1,100	13,700	193,800	220,200
14 "	9,100	1,100	0,700	1,300	12,200	204,700	232,400
16 "	6,100	1,000	0,600	1,000	8,700	212,400	241,100
18 "	3,100	1,200	0,400	1,300	6,000	217,000	247,000
20 "	-	1,100	0,900	1,300	3,300	219,000	250,300
35 "	-	1,000	-	2,000	3,000	220,300	253,300

A partir de ces valeurs, deux courbes ont été établies que nous reproduisons sur le même schéma (fig. E).

- La courbe I correspond aux lipides précipités (lipides amorphes et cristaux) c'est-à-dire aux lipides réellement utilisables après extraction par l'éthanol des graines étudiées.

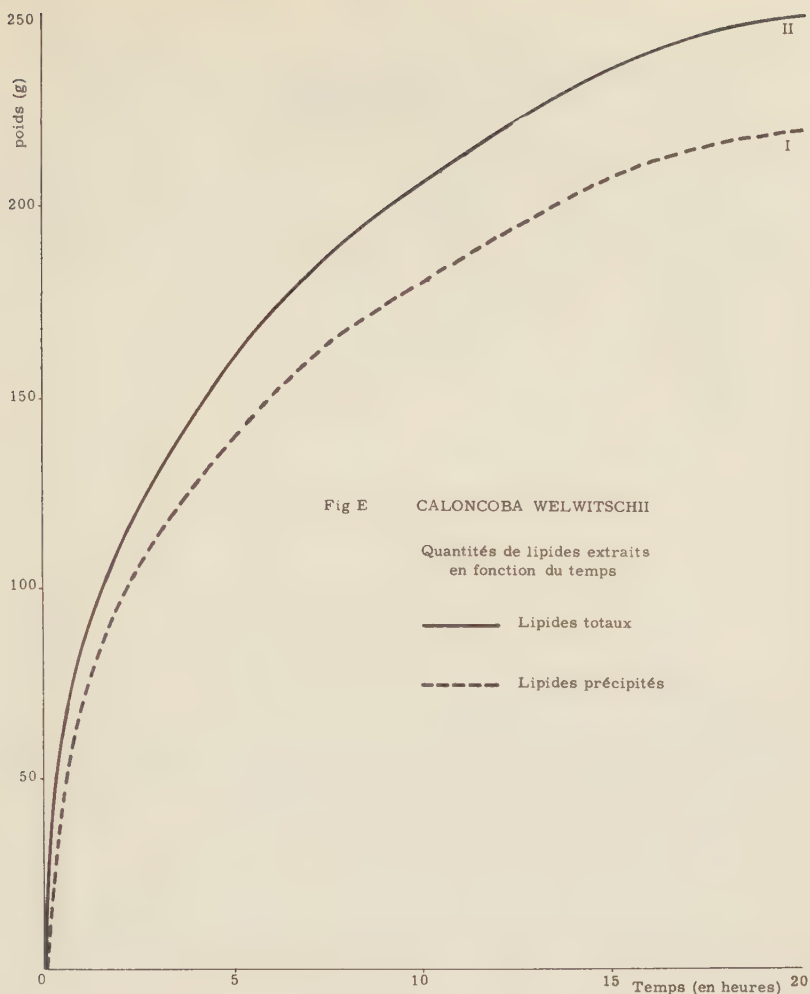
- La courbe II correspond aux lipides totaux (lipides précipités et lipides acides).

Les deux courbes sont assez régulières, d'allure hyperbolique. Elles ont été établies directement à partir des valeurs figurant au tableau n° 14, sans qu'il ait été nécessaire d'avoir recours aux moyennes mobiles ou pondérées, et nous renseignent immédiatement sur le rendement obtenu en fonction du temps d'extraction, c'est-à-dire sur la valeur pratique de la méthode : les résultats sont particulièrement satisfaisants puisque près des deux tiers des lipides sont extraits en cinq heures (162 g sur 253,5 g) et la quasi totalité (250,3 g sur 253,3 g) en 20 heures.

Enfin, il suffit de comparer les deux courbes pour déterminer la quantité de lipides acides retenues en solution dans l'éthanol. Cette valeur est relativement élevée dans le présent exemple en raison de la très forte acidité des graines soumises à l'extraction.

Les proportions respectives de lipides amorphes, de cristaux et de lipides non cristallisables, sont du même ordre dans les 16 ballons soit environ :

- 65 % de lipides amorphes ;
- 15 à 20 % de cristaux ;
- 10 à 25 % de lipides non cristallisables.



Le refroidissement des ballons s'est effectué dans des conditions aussi semblables que possible. Toutefois, les ballons 15 et 16 n'ont pas laissé déposer de lipides amorphes, mais uniquement des cristaux, en raison de la faible quantité de lipides subsistant dans ces fractions. Ceci, déjà, nous permet de penser qu'il n'y a pas de différence fondamentale dans la nature chimique des lipides amorphes et des lipides cristallisés, mais qu'il ne s'agit là que de deux formes en équilibre. C'est ce que l'étude des caractéristiques physiques et chimiques de chaque fraction va d'ailleurs confirmer.

3 - CARACTERES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES FRACTIONS -

Nous avons étudié qualitativement les différentes fractions afin de les comparer entre elles et de déterminer si le fractionnement a permis de séparer des lipides de constitution chimique différente. L'indice d'acide, l'indice d'iode et le pouvoir rotatoire ont été systématiquement déterminés. Les valeurs des indices d'acide figurent au tableau n° 15.

Tableau n° 15

Extraction fractionnée des graines de Caloncoba Welwitschii
Indice d'acide des fractions

N°	Lipides amorphes (après 24 h. à 20 °C)	Cristaux (après 24 h à 20 °C)	Cristaux (après 24 h à - 5 °C)	Lipides non cristallisables
1	1,7	12,4	26,9	119,5
2	1,6	8,3	16,1	97,3
3	1	5,1	9,8	87
4	-	-	-	-
5	0,8	4,2	4,8	42,7
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	0,8	2,4	2,7	12,7
9	-	-	-	-
10	0,8	2,2	2,7	11,2
11	-	-	-	-
12	0,7	1,9	2,4	4,7
13	-	-	-	-
14	0,6	1,5	2,3	3,2
15	0,5	1,4	1,8	2,1
16	0,2	0,8	1,5	2,1

On observe que les huiles sont d'autant moins acides qu'elles sont moins solubles. Les lipides qui précipitent spontanément sont presque neutres, tandis que les lipides restant en solution dans l'alcool sont très acides. Les cristaux ont une acidité intermédiaire. Ces renseignements tirés de l'examen des colonnes lues horizontalement permettent aussi d'interpréter la suite des chiffres placés sur une même ligne verticale. Les acides gras - plus solubles - sont extraits les premiers, ce qui explique les acidités régulièrement décroissantes de haut en bas. (Remarquons en passant que l'acidité moyenne des huiles contenues dans les graines qui ont été utilisées pour cette étude, était beaucoup plus élevée que celle d'autres espèces que nous avons eu l'occasion d'examiner et notamment de *Caloncoba echinata*). Ces résultats sont peu différents de ceux obtenus par Mme VIEUX [121] lors des extractions fractionnées des huiles de maïs par l'éthanol.

Les indices d'iode et les déviations polarimétriques permettent enfin de caractériser la constitution chimique des différentes fractions. Les résultats globaux figurent dans le tableau n° 16.

Afin de pouvoir comparer chaque fraction aux lipides résultants d'une extraction totale par l'éthanol et par l'éther de pétrole nous rappelons dans le tableau n° 17, les caractères de ces lipides totaux qui ont déjà été indiqués dans les tableaux n° 3 et n° 6.

Tableau n° 16

Extraction fractionnée des graines de Caloncoba Welwitschii
Indice d'iode et déviation polarimétrique des fractions

Numéro des fractions	Lipides amorphes après 24 h à 20 °C		Cristaux			Lipides non cristallisables (en phase alcoolique)	
			après 24 h à 20 °C		après 24 h à -5 °C		
	Déviation polari- métrique	indice d'iode	Déviation polari- métrique	indice d'iode	indice d'iode	Déviation polari- métrique	indice d'iode
1	50° 53'	96,9	42°	82,1	88,5	22° 24'	88,6
2	50° 25'	95,1	-	-	-	27° 45'	-
3	51° 06'	95,7	42° 42'	83,5	90,6	29° 45'	98,2
4	50° 50'	95,3	-	-	-	-	-
5	50° 41'	95,6	42° 02'	82,8	92,1	-	104,3
6	50° 20'	95,4	-	-	-	-	-
7	51°	95,7	-	-	-	-	111,3
8	50° 28'	96	41° 20'	80,4	93,9	45° 20'	112,2
9	50° 36'	95,5	-	-	-	-	111,8
10	49° 53'	95	-	-	-	-	-
12	50° 45'	95,1	43° 12'	86,6	92,7	-	109,6
14	50° 26'	95,3	-	-	-	-	-
16	50° 15'	94,9	45°	89,7	93,4	46° 40'	98,2
18	50° 58'	95,7	-	-	-	-	-
20	50° 45'	95,9	-	-	-	47° 36'	-

Tableau n° 17

Extraction totale des graines de Caloncoba Welwitschii
Caractères des lipides

Nature des lipides	Rendement pour 100 g graines	Indice d'acide	Indice d'iode	Déviation polarimétrique
<u>Extraits par l'éthanol</u>				
- Lipides préci- pités à 20 °C	40	1,7	95,2	49° 35'
- Lipides non cristallisables	3,8	93,7	85,6	19° 45'
<u>Extraits par l'éther de pétrole</u>	44	12,1	93,8	48° 45'

4 - ANALYSE DES RESULTATS -

- Les graisses amorphes sont de composition analogue, puisque l'indice d'iode et le pouvoir rotatoire sont pratiquement identiques, mais plus élevés que celui des glycérides précipités lors d'une extraction totale. Les variations ne portent que sur la composition des cristaux et des lipides acides restés en solution dans l'éthanol.

- Les cristaux de première récolte - L'indice d'iode et le pouvoir rotatoire de ces cristaux restent toujours inférieurs à ceux des fractions amorphes

correspondantes. Ce résultat à vrai dire est, à première vue, surprenant. L'on pouvait en effet penser que ces cristaux possèderaient un indice d'iode intermédiaire entre celui des glycérides précipités amorphes, et celui des lipides acides puisque leur solubilité dans l'éthanol est intermédiaire ; en d'autres termes, ils seraient légèrement plus riches en acide gorlique que les glycérides précipités. Ce n'est cependant pas le cas. On pourrait attribuer cette chute de l'indice d'iode et de la déviation polarimétrique à la présence d'acides gras libres, dont la richesse en acide palmitique est connue. Mais cette interprétation est également à rejeter, car les indices d'iode de ces cristaux restent très faibles après la 3ème fraction, dans laquelle l'indice d'acide révèle que le taux d'acides gras libres est devenu négligeable.

Si l'on ne peut imputer aux acides gras libres la chute de l'indice d'iode, il faut admettre que les glycérides eux-mêmes sont riches en acides saturés. En d'autres termes, les glycérides précipitant les derniers sont plus riches en acide palmitique que les glycérides amorphes, ce qui revient à dire qu'ils sont plus solubles dans l'alcool que ces derniers. Ceux-ci sont essentiellement constitués par des acides cyclopenténiques actifs, comme le montre leur déviation polarimétrique élevée. Ce phénomène, étonnant à première vue, peut s'expliquer par le fait que l'acide palmitique, ne comptant que 16 atomes de Carbone, est plus soluble que les acides en C_{18} dans l'éthanol.

Enfin, cette observation nous permet d'expliquer aussi la diminution concomitante des indices d'iode et des pouvoirs rotatoires des cristaux jusqu'à la fraction n° 8, et leur remontée parallèle ensuite. L'alcool dissoudrait d'abord les glycérides légèrement plus riches en acide gorlique (ce qui se vérifie par l'indice d'iode plus élevé de la fraction n° 1), puis les glycérides légèrement plus riches en acide palmitique (jusqu'à la fraction n° 8 notamment). Les derniers glycérides extraits sont pauvres, à la fois en acide gorlique et en acide palmitique, comme le prouve l'indice d'iode élevé pour les cristaux (peu d'acide palmitique) et abaissé pour les lipides restés dissous en phase alcoolique (peu d'acide gorlique).

- Les cristaux de deuxième récolte se situent par leurs caractères chimiques, entre les cristaux de première récolte et les lipides restés en solution. Ce fait est particulièrement frappant lorsqu'on examine chaque colonne horizontale. On conçoit d'ailleurs aisément que la nature de ces glycérides soit intermédiaire entre celle des cristaux et celle des lipides non cristallisables puisqu'ils précipitent entre les premiers et les seconds.

- Lipides acides - Les caractéristiques des fractions restées solubles dans l'alcool répondent à notre attente : les premières, très riches en acides gras libres ont un indice d'iode et un pouvoir rotatoire bas. Elles sont solides. Puis ces fractions s'enrichissent en glycérides riches en acide gorlique, au fur et à mesure que les taux en acides libres diminuent. Pour les fractions médianes, leur richesse en acide gorlique se manifeste par leur très haut indice d'iode. Enfin les dernières fractions correspondent à des glycérides pauvres en acide gorlique.

5 - CONCLUSIONS -

Tous ces renseignements tirés du tableau n° 16 expriment la tendance générale des propriétés dissolvantes de l'alcool, s'exerçant d'abord à l'égard des acides gras, puis des glycérides riches en acide gorlique, puis de ceux contenant de l'acide palmitique, des acides cyclopenténiques enfin en dernier lieu. Mais ceci ne correspond qu'à une tendance très générale ; en fait, les variations sont très faibles, les compositions des lipides extraits d'heure en heure étant finalement très voisines. Si ces résultats ont un intérêt théorique, il est évident qu'on ne peut en tirer aucune conclusion pratique, sinon celle-ci, que les cristaux sont des glycérides plus riches en acides linéaires saturés. Nous tenterons ultérieurement de tirer profit de cette constatation et d'obtenir, en éliminant à la

fois les lipides acides et les cristaux, des glycérides précipités enrichis en produits actifs et à pouvoir rotatoire élevé.

Remarquons enfin que la quantité totale de lipides restés en solution dans l'alcool au cours de cette expérience est bien plus élevée que la quantité de lipides retenue en phase alcoolique au cours d'une extraction totale. En fait, tout se passe ici comme si nous avions reçu l'extractif de 600 g de graines broyées dans 16 litres d'alcool, chacun des 16 ballons contenant 1 litre de solvant. La quantité totale de lipide retenue en phase alcoolique au cours de cette expérience peut se déduire des renseignements figurants au tableau n° 14. Elle s'élève à 253,3 g - 220,3 g soit 33 g pour un total de 253 g de lipides extraits. Et d'autres termes pour 100 g de lipides extraits : 87 g seulement précipitent au cours du refroidissement et 13 g restent en solution alcoolique. Si au contraire, on opère l'extraction dans les conditions ordinaires avec 1 500 ml d'alcool, soit 10 fois moins environ, le tableau n° 17 nous indique que 3,8 g de lipides restent en solution sur 44,6 g de lipides extraits, c'est-à-dire 8,4 pour 100 g seulement de lipides alors que 91,6 g pour cent cette fois précipitent. Il suffit de comparer ces deux résultats pour se rendre compte de l'influence du volume d'alcool utilisé sur la répartition des lipides totaux entre les deux phases soluble et précipitante, influence qui apparaît ici beaucoup plus nettement que dans l'expérience mentionnée à la page 46.

La différence entre les deux chiffres résulte bien entendu de la solubilisation à froid de quantités importantes de glycérides mixtes, riches en acide gorlique, dans ce grand volume d'alcool. On voit qu'à tous égards, il serait particulièrement désavantageux, comme nous l'avons déjà indiqué ci-dessus, d'utiliser un trop grand volume de solvant, lequel retiendrait une quantité trop importante de glycérides à haut indice d'iode.

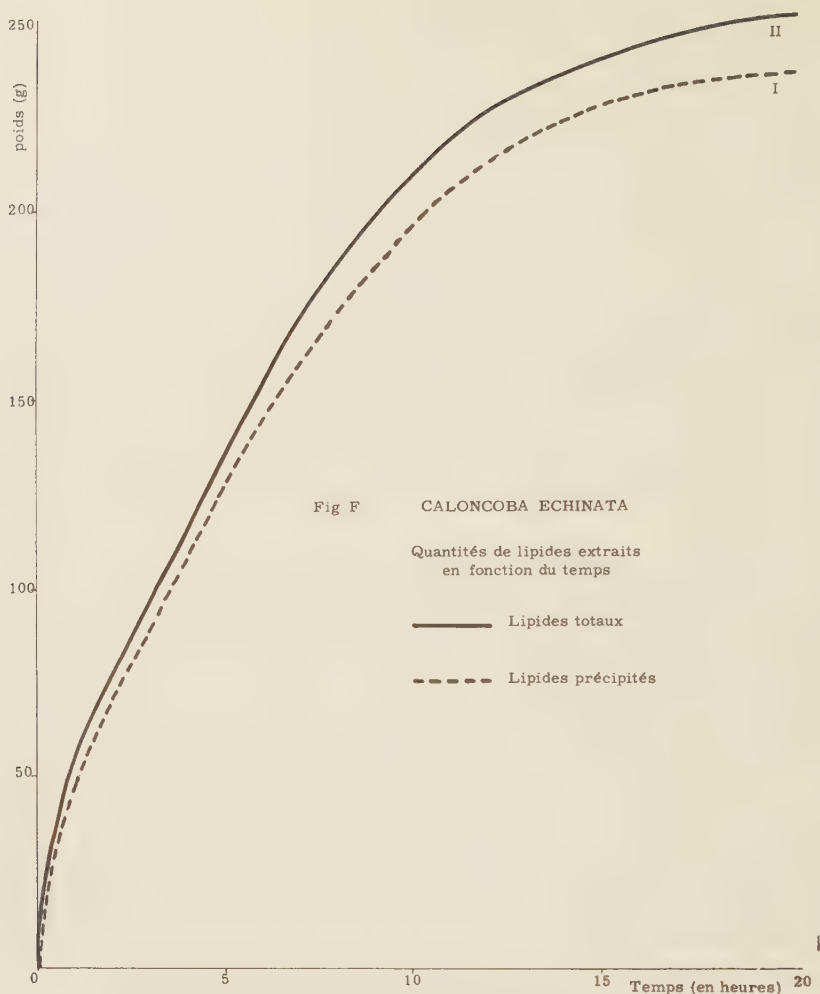
On pourrait évidemment inverser le problème et songer à mettre à profit cette dernière propriété pour extraire une partie de ces glycérides à haut indice d'iode. Nous pensons que cette méthode doit être rejetée, d'abord parce qu'elle exigerait des quantités très importantes d'alcool pour des rendements minimes en glycérides, ensuite, parce qu'elle ne permettrait pas et de loin l'extraction de la totalité des glycérides monogorliques, enfin parce qu'il serait ensuite nécessaire de séparer ces glycérides des nombreux constituants des "lipides acides", tâche délicate, longue et qui risquerait d'entraîner des pertes importantes en produits actifs.

Nous étudierons d'ailleurs dans la dernière partie de ce travail des méthodes beaucoup plus efficaces pour séparer les glycérides et les acides à haut indice d'iode.

B - EXTRACTION DE CALONCOBA ECHINATA ET GENERALISATION DES RESULTATS

1 - MODE OPERATOIRE UTILISE -

Avant de pouvoir tirer des conclusions définitives sur l'extraction par l'éthanol, il était nécessaire de généraliser les résultats obtenus lors de l'extraction de Caloncoba Welwitschii précédemment étudiée. Aussi avons-nous répété l'expérience qui vient d'être décrite, en utilisant, cette fois, des graines de Caloncoba echinata que nous venions de recevoir de la Côte d'Ivoire. Le mode opératoire utilisé a été rigoureusement identique et nous avons à nouveau séparé, pour chaque fraction, les lipides amorphes, les deux séries de cristaux, enfin les "lipides acides" restés en solution. Mais nous nous sommes contentés de procéder seulement à l'analyse des fractions correspondant à la 1ère, 5ème, 10ème et 20ème heure, pensant que les indications fournies seraient suffisantes pour suivre dans de bonnes conditions, l'évolution de l'extraction. La déviation polarimétrique de ces fractions n'a pas été déterminée, puisque l'indice d'iode nous



l'avons vu, permet de tirer des conclusions suffisamment précises sur la constitution chimique des lipides. Le poids total de chaque fraction a été déterminé et figure au tableau n° 18 puis les courbes exprimant le rendement en huile en fonction du temps ont été établies comme précédemment (fig. F).

2 - COMPARAISON ENTRE LA VITESSE DES DEUX EXTRACTIONS -

L'allure des courbes d'extraction rappelle celle des deux courbes obtenus lors de l'épuisement des graines de Caloncoba Welwitschii, bien que l'une et l'autre ne soient pas tout-à-fait superposables et se distinguent par deux caractères :

- l'extraction des graines de Gorli a été nettement moins rapide que celle des graines de Caloncoba Welwitschii. Alors que dans ce dernier cas, les deux tiers étaient pratiquement extraits après 5 heures, il faut attendre près de 7 heures pour arriver à ce résultat. De même la quantité d'huile obtenue après une heure d'épuisement est sensiblement plus faible (53,1 g contre 83,8 g dans l'exemple précédent). Nul doute qu'il faille rechercher la cause de cette différence dans les acidités très variables des deux échantillons de graines. Alors que lors de l'épuisement des graines de Caloncoba Welwitschii, le taux très élevé d'acides

gras libres favorisait la solubilisation des glycérides, nous avons ici au contraire des graines très pauvres en acides gras de sorte que la solubilisation des lipides neutres est plus lente et plus difficile. En effet, l'épuisement par l'éthanol est d'autant plus rapide que les graines sont plus acides et sera particulièrement indiqué pour des échantillons très riches en acides gras libres. Les exemples choisis constituent deux limites entre lesquelles pourraient venir se placer les différents échantillons de graines de chaulmoogra d'acidité moyenne, que nous avons examinés.

- Pour ce même motif, la proportion des lipides acides restés en solution est beaucoup plus faible ici que lors de l'extraction précédente, puisqu'elle n'est que de 18,4 g alors qu'elle s'élevait à 33 g dans l'exemple précédent, pour une quantité globale de lipides extraits sensiblement identique. Ainsi apparaît une fois de plus, l'influence de l'acidité libre sur la répartition des lipides totaux entre la phase lipidique précipitante et la phase alcoolique liquide.

Tableau n° 18

Extraction fractionnée des graines de Caloncoba echinata
Poids des fractions

Durée de l'extraction	Lipides précipités			Lipides acides solubles	Quantités totales de lipides extraits par heure	Quantités de lipides précipités (I+II+III) obtenus en fonction du temps d'extraction (courbe I)	Quantités totales de lipides extraits en fonction du temps d'extraction (courbe II)
	I Amorphe	II 1ère série de cristaux	III 2ème série de cristaux				
1 Heure	45,800	2,800	0,400	4,100	53,100	49,000	53,100
2	13,600	6,400	0,600	1,000	21,600	69,600	74,700
3	14,300	5,600	0,600	0,800	21,300	90,100	96,000
4	15,100	4,100	0,600	1,100	20,900	109,900	116,900
5	13,800	4,800	0,500	0,900	20,000	129,000	136,900
6	13,300	2,600	0,600	0,800	17,300	145,500	154,200
7	10,400	4,900	0,500	0,700	16,500	161,300	170,700
8	8,800	3,800	0,600	0,800	14,000	174,500	184,700
9	6,800	4,100	0,600	0,800	12,300	186,000	197,000
10	5,600	4,700	0,500	0,800	11,600	196,800	208,600
12	12,400	3,200	0,600	1,000	17,200	213,000	225,800
14	6,000	2,600	0,400	0,900	9,900	222,000	235,700
16	3,800	2,100	0,600	0,900	7,400	228,500	243,100
18	-	4,200	0,100	0,800	5,100	232,800	248,200
35	-	7,600	-	3,000	10,600	240,400	258,800

3 - CARACTERES CHIMIQUES DES FRACTIONS -

Au tableau n° 19, figurent les caractéristiques des différentes fractions choisies comme témoin.

Tableau n° 19

Extraction fractionnée des lipides de Caloncoba echinata par l'éthanol
Indice d'acide et indice d'iode des fractions

Nature des Lipides	Fraction n° 1		Fraction n° 5		Fraction n° 10		Fraction n° 20	
	indice d'acide	indice d'iode	indice d'acide	indice d'iode	indice d'acide	indice d'iode	indice d'acide	indice d'iode
Lipides amorphes précipités	0,6	97,2	0,2	95,5	0	95,6	0	95,6
Cristaux précipités après 24 h à 20°C après 24 h à -5°C	1,2	87,1	0,3	86,3	0,1	88,8	0	91,7
	5,8	90,4	1	92,3	0,4	95,7	0,2	97,3
Lipides acides solubles	95,9	92,4	10,8	107,6	4,2	110	0,6	100,2

La physionomie de ces résultats est tout à fait identique à celle déjà observée pour Caloncoba Welwitschii. Cependant les graines de Gorli contenant beaucoup moins d'acides gras libres, les indices d'acide ont des valeurs beaucoup plus faibles. Quant aux glycérides précipités après 24 heures au sein du miscella abandonné au refroidissement, leur indice d'iode révèle également la présence d'acides saturés linéaires. Cependant les valeurs de ces indices d'iode sont légèrement plus élevées que celles des fractions correspondantes de Caloncoba Welwitschii du Gabon. Il en est de même d'ailleurs pour les indices d'iode des cristaux de seconde récolte. Il semble donc bien se confirmer que les lipides de Caloncoba echinata sont légèrement plus pauvres en acides saturés que les lipides de Caloncoba Welwitschii du Gabon, ce que permettait déjà de supposer l'indice plus élevé des lipides totaux. Ces remarques étant faites, les résultats obtenus ici sont similaires à ceux figurant aux tableaux 15 et 16.

4 - INFLUENCE DU MODE DE REFROIDISSEMENT DU MISCELLA SUR LA CRISTALLISATION DES LIPIDES -

Enfin avant de terminer cette étude, nous rendrons compte d'une observation fortuite qui a attiré notre attention au cours de l'extraction fractionnée des graines de Caloncoba echinata. Au lieu d'abandonner au refroidissement les ballons contenant les miscella, nous avons transvasé leur contenu bouillant dans des récipients froids. La solution se trouble abondamment et devient lactescente ; la cristallisation s'amorce aussitôt, mais n'évoluera pas selon le mode habituel : le beurre obtenu après refroidissement n'est plus aussi compact et ne peut plus être, à proprement parlé, qualifié de "glycérides amorphes". Il est en effet très difficile de le séparer des cristaux car il semble y avoir continuité parfaite entre les deux formes. On observe des intermédiaires constitués par des agglomérats denses de cristaux et dont le volume diminue peu par fusion (la caractéristique essentielle des cristaux est en effet leur très grande légèreté, de sorte que leur volume est très important, et leur poids très faible). Dans ces conditions, la séparation entre lipides amorphes et cristaux est difficile et la proportion de cristaux obtenus est toujours élevée. Les solutions mères sont ensuite portées à basse température mais elles ne donnent lieu qu'à une cristallisation infiniment tenue et dont le poids est faible. La quantité de lipides retenue en phase alcoolique ne varie pas. On peut donc dire que, par ce procédé, la cristallisation a été plus brutale et plus totale, puisque la quantité de lipides susceptibles de précipiter par la suite est presque nulle. Elle a permis d'obtenir en outre des glycérides plus homogènes. Quant à la composition chimique, il est malaisé de séparer cristaux et masses amorphes et leurs caractéristiques chimiques sont voisines ; la séparation de cristaux riches en acide palmitique devient plus difficile.

Nous avons appris par la suite que ce phénomène était connu et avait même fait l'objet d'applications pratiques dans le domaine des graisses alimentaires. Celles-ci sont, en effet, refroidies dans ces conditions afin d'obtenir un produit parfaitement homogène et constitué par de très fins cristaux.

C - ENRICHISSEMENT DES GLYCERIDES EN ACIDES OPTIQUEMENT ACTIFS

Les expériences précédentes ont mis en évidence la teneur élevée en acide palmitique des cristaux apparus au cours du refroidissement du miscella ; la chute concomitante de l'indice d'iode et de la déviation polarimétrique en sont une preuve incontestable. En éliminant ces cristaux et en ne recueillant que les glycérides amorphes précipités au fond du ballon, nous devrions donc obtenir un produit encore enrichi en acides cyclopenténiques actifs. De plus, les cristaux étant toujours plus acides que les glycérides, cette même opération devrait permettre de diminuer également l'indice d'acide de ces glycérides. Nous avons donc soumis à l'extraction, des graines de Caloncoba echinata et de Caloncoba Welwitschii du Gabon par la méthode habituelle, mais, cette fois, nous avons

séparé les cristaux des glycérides amorphes. Les uns et les autres ont été analysés, et dans le tableau n° 20 les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour les glycérides précipités totaux et qui figurent au tableau n° 6.

Tableau n° 20

Séparation des cristaux et des glycérides amorphes

Caractères des lipides	<u>Caloncoba echinata</u>			<u>Caloncoba Welwitschii</u>		
	Glycérides amorphes	Cristaux	Glycérides précipités totaux	Glycérides amorphes	Cristaux	Glycérides précipités totaux
Pourcentage des glycérides totaux	96	4	-	95	5	-
Indice d'acide	0,46	2,1	0,5	1,55	9,8	1,7
Indice d'iode	96,1	85,4	95,4	96	82,1	95,2
Déviati on polarimétrique	51°2'	44°15'	50°42'	49°58'	42°20'	49°35'

L'étude de ces résultats révèle que la séparation des cristaux représente une perte en glycérides de l'ordre de 5 % environ, mais elle permet d'obtenir des glycérides de constitution chimique très légèrement plus favorable que celles des glycérides précipités totaux. L'avantage il est vrai, est si modeste, qu'il n'y a pas lieu, pensons-nous, de généraliser cette méthode car elle entraîne une perte trop considérable de produits cyclopenténiques actifs en comparaison de l'amélioration très légère des huiles finalement obtenues.

Il convient par ailleurs de remarquer qu'au cours de l'extraction par l'alcool des graines de certaines espèces, il n'apparaît aucune cristallisation spontanée : les glycérides précipités constituent un beurre homogène au fond du ballon, alors que la solution mère reste limpide et ne donne naissance à aucune cristallisation. C'est ce qui se produit par exemple lors de l'extraction des graines de Caloncoba glauca du Cameroun. Même portées à basse température, les phases alcooliques ne laissent apparaître aucun cristal. Or nous verrons par ailleurs que les graines de cette espèce sont pratiquement dépourvues d'acide palmitique (moins de 1 %). Comme les cristaux sont précisément caractérisés par leur teneur en cet acide linéaire saturé, l'on conçoit qu'il ne s'en forme pas ici. Nous n'avons pas davantage observé la formation de quantités notables de cristaux (quelques aiguilles seulement), lors de l'extraction par l'alcool de Caloncoba Welwitschii du Cameroun. Mais ici encore l'indice d'iode est élevé, ainsi que la déviation polarimétrique et tout porte à croire, bien que l'analyse des lipides de cet échantillon n'ait pas été effectuée, qu'il est également très pauvre en acide palmitique, ce qui explique l'absence de cristaux. Dans tous les autres cas, l'on observait des cristaux plus ou moins abondants, d'aspects variés et dont l'indice d'iode était toujours inférieur à celui des lipides amorphes. Aussi, l'apparition de cristaux lors du refroidissement du miscella semble-t-elle être en rapport avec la richesse en acide palmitique des graines étudiées.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DES CONSTITUANTS NON LIPIDIQUES DE LA PHASE ALCOOLIQUE

Il reste enfin à étudier brièvement la nature des constituants non lipidiques résultant de l'évaporation sous pression réduite et gaz inerte de la phase alcoolique et de l'épuisement de l'extrait ainsi obtenu par l'éther de pétrole bouillant. On obtient un résidu insoluble dans ce solvant, et qui offre toujours un aspect identique, quelles que soient la nature et l'espèce botanique des graines oléagineuses dont il provient. C'est un produit mou, visqueux, de consistance pâteuse, de forte coloration brun-rougeâtre, d'odeur spéciale et caractéristique, de saveur sucrée, amère et astringente. La quantité extraite varie de 2,5 à 5 g pour 100 de graines oléagineuses et ne dépasse jamais cette valeur pour des graines de "Chaulmoogra". Nous avons, très sommairement, déterminé les principaux constituants de ce résidu.

A - RECHERCHE DES GLUCIDES

La recherche des sucres par la liqueur de Fehling est très fortement positive sans qu'il soit nécessaire de procéder à une hydrolyse préalable. Par contre, la réaction de SELIVANOFF est négative, ce qui permet de conclure à l'absence de fructose. Nous avons alors préparé l'osazone selon la méthode classique : les magnifiques cristaux "en branche de genêt" obtenus sont tout à fait caractéristiques de glucose, en l'absence de fructose. D'autre part le résidu, remis en solution alcoolique concentrée, abandonne, au bout de quelques mois, une cristallisation plus ou moins abondante selon les espèces (*Camptostylus Mannii* paraissant donner les récoltes les plus abondantes) ; les cristaux obtenus sont incolores ; après lavage par l'éthanol, puis par l'éther sulfurique, ils sont dissous dans l'eau : le pouvoir rotatoire spécifique ($66^{\circ}5$), la saveur sucrée de la solution et le pouvoir réducteur après hydrolyse ne laissent aucun doute sur leur nature : il s'agit de saccharose.

B - RECHERCHE DES PROTIDES

Le produit donne, avec l'eau, une solution plus ou moins trouble. La réaction de la ninhydrine est très fortement positive dans cette solution aqueuse, et l'on obtient une magnifique coloration bleu violacée. Par contre, toutes les réactions caractéristiques des protides restent négatives. La réaction par la ninhydrine doit donc correspondre à des acides aminés ou à de courts peptides. L'insolubilité des protides dans l'éthanol bouillant explique leur absence dans la phase alcoolique liquide.

C - DERIVES PHOSPHORES

Le phosphore a été recherché dans ce produit après destruction sulfonitrique de la matière organique. L'acide phosphorique libéré est combiné au molybdate d'ammonium et le complexe est réduit par un mélange d'hydroquinone et de sodium. La réaction est toujours fortement positive. Nous avons ensuite effectué cette même opération sur une solution aqueuse du produit, sans procéder à une minéralisation par le mélange sulfo-nitrique. La réaction est également positive (ce qui met en évidence la présence de phosphates minéraux) mais la coloration bleue est beaucoup plus faible. De sorte que ce résidu contient également des dérivés phosphorés organiques divers, mais non lipidiques car les phospholipides ont été entraînés lors de l'épuisement de l'extrait par l'éther de pétrole.

D - AUTRES CONSTITUANTS

La constitution de ce résidu est donc assez complexe ; elle correspond à l'ensemble des composants alcoolosolubles de la matière première soumise à l'extraction. De plus, comme l'alcool utilisé n'est pas absolu et qu'en outre l'humidité de la matière première à épuiser contribue toujours à abaisser légèrement son titre, il entraîne également de petites quantités de substances hydrosolubles. Le résidu contient aussi des pigments et des tannins mis en évidence par leur saveur astringente, et surtout par la coloration qu'ils donnent avec le chlorure ferrique.

E - LA PHASE INTERMEDIAIRE

Si l'extraction alcoolique se poursuit durant un temps très long, le taux des constituants non lipidiques dissous, augmente. La phase alcoolique devient alors de plus en plus foncée et de plus en plus concentrée, de sorte que, lors du refroidissement, elle peut se décharger de certains de ses constituants qui vont précipiter et venir constituer une mince pellicule à la surface de la phase lipidique qui s'est concrétisée au fond du ballon. On voit apparaître alors une "phase intermédiaire" très fine qui se résout parfois en quelques grumeaux, ou qui peut même faire totalement défaut. La quantité de produits non lipidiques ainsi précipités augmente avec le temps d'extraction. Elle est pratiquement nulle si l'extraction n'a duré qu'une heure ou deux, et au contraire, relativement importante si l'extraction s'est prolongée durant un temps bien supérieur au temps nécessaire à l'extraction totale des lipides. On retrouve cette "troisième couche" dans toutes les extractions par l'alcool, et, généralement dans des proportions bien supérieures à celles qui ont été obtenues pour les graines de Caloncoba.

Nous avons bien entendu retrouvé dans cette phase intermédiaire les mêmes constituants que dans la fraction non lipidique précédemment étudiée : à savoir du phosphore, du saccharose, des stérols mais pas de glucose.

TITRE II:PRÉPARATION DES ESTERS ÉTHYLIQUES

L'éthanol bouillant permet d'obtenir, nous venons de le voir, dans de bonnes conditions de rendement, des glycérides très purs et neutres qui peuvent être utilisés directement comme médicaments antilépreux sans avoir à subir de traitement préalable.

Cependant les "huiles de Chaulmoogra" elles-mêmes sont aujourd'hui moins couramment usitées que certains de leurs dérivés, en particulier leurs esters éthyliques. L'intérêt de l'emploi de l'éthanol comme solvant d'extraction des huiles antilépreuses serait donc considérablement accru s'il permettait, non seulement d'obtenir les glycérides, mais aussi de préparer rapidement ces esters éthyliques qui sont aujourd'hui le produit de base de toute la médication chaulmoogrique. L'éthanol pourrait être alors considéré comme le solvant de choix des huiles de Chaulmoogra. Aussi tenterons-nous dans cette étude, de mettre au point, un procédé de préparation des esters, dérivé de la méthode d'extraction des graines oléagineuses par l'éthanol bouillant précédemment décrite.

Néanmoins, avant d'exposer ce travail, il n'est pas inutile de retracer ici brièvement l'évolution qui, de l'utilisation empirique de certaines graines dites "de chaulmoogra" à l'emploi, aujourd'hui systématique, des esters éthyliques d'acides cyclopenténiques, témoigne des progrès récents accomplis par la thérapeutique antilépreuse. L'on comprendra mieux ainsi, l'intérêt que nous portons aux esters éthyliques et les motifs qui nous ont guidé dans la recherche d'une méthode capable d'en fournir des quantités importantes, dans des conditions avantageuses.

CHAPITRE I

LES PRINCIPALES FORMES D'UTILISATION DES MÉDICAMENTS

CHAULMOOGRIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA LÈPRE

L'action thérapeutique du Chaulmoogra sur la lèpre était déjà connue dans l'antiquité. Le traitement de la maladie consistait alors à ingérer des graines dites "de Chaulmoogra" dont les origines botaniques et même géographiques sont restées douteuses jusqu'au début de ce siècle.

Puis au fur et à mesure des découvertes relativement récentes quant à la constitution chimique des huiles et aux espèces productrices dont elles proviennent, des méthodes de traitement moins empiriques ont été mises en oeuvre. Nous ne pouvons évidemment, dans le cadre de ce court chapitre introductif, procéder à une étude complète des différentes formes d'administration et de toutes les méthodes de traitement fondées sur l'utilisation du Chaulmoogra et de ses dérivés ; aussi, nous contenterons-nous de faire un bref tour d'horizon sur les modes d'utilisation des trois grands types de médicaments chaulmoogriques.

- les huiles proprement dites ;
- les acides et leurs sels ;
- les esters éthyliques.

A - LES HUILES DE CHAULMOOGRA

De nombreux auteurs ont préconisé l'utilisation de l'huile de Chaulmoogra elle-même. E. BOUILLAT et D. TALEC [17] l'ont administré par voie buccale et ont pu établir que des doses de 30 à 40 g par 24 heures peuvent être ingérées sans que l'on note de signes d'intolérance appréciables. V. LABERNADIE et N. LAFFITTE [68] l'ont administrée également par voie buccale, à doses plus réduites mais dans leurs conclusions, ils rapportent que l'"emploi de l'huile per os a été trop court pour avoir une signification thérapeutique". Par contre, ils ont obtenu des résultats satisfaisants en pratiquant des injections par voie sous-cutanée d'huile d'Hydnocarpus Wightiana créosotée à 4 % dont l'emploi a été préconisé par MUIR [80 et 81] élève du grand léprologue ROGERS. V. LABERNADIE et E. ANDRE [67] ont également pratiqué des injections intraveineuses d'huile pure avec de bons résultats. On trouvera d'ailleurs dans la thèse de R. L. JUMELLE [59] une étude détaillée des différentes thérapeutiques utilisées.

Mais l'utilisation des huiles de Chaulmoogra proprement dites présente un certain nombre d'inconvénients et tout d'abord, comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus, la nécessité d'obtenir une huile neutre avec un rendement satisfaisant. Nous pensons avoir levé cette première difficulté en décrivant une méthode d'extraction par l'éthanol bouillant permettant d'obtenir rapidement et avec un très bon rendement des lipides très purs et presque neutres. Cependant une autre difficulté reste à surmonter : les huiles de Chaulmoogra sont concrètes sous les climats tempérés ou froids, certaines le sont même sous les climats

tropicaux, ce qui interdit leur injection directe par voie sous-cutanée. Certes, dans les régions tropicales, plusieurs espèces fournissent des graisses qui restent fluides : c'est par exemple, le cas d'Hydnocarpus Wightiana. Et nous avons de solides raisons de penser que les lipides provenant d'espèces originaires du Cameroun telles que Caloncoba glauca et peut être Caloncoba Welwitschii, en raison de leur teneur élevée en acide gorlique et de leur point de fusion bas, sont également fluides sous les climats africains. Mais elles conservent toujours la tendance à se concrétiser, notamment au moment de l'injection, ce qui rend leur administration difficile et douloureuse.

C'est pourquoi, l'usage des huiles de Chaulmoogra elles-mêmes est, petit à petit, tombé en désuétude, alors que l'utilisation de plusieurs de leurs dérivés était préconisée.

B - LES ACIDES ET LEURS SELS

Dès 1919, ROGERS [111-112] utilisait les savons de sodium des acides gras extraits de l'huile, sous le nom de "gynocardate de sodium", expression qui n'a d'ailleurs guère de sens puisqu'il n'existe pas d'acide gynocardique dans les huiles de Chaulmoogra. De leur côté, A.J. GELARIE et F.R. GREENBAUM [43] utilisent des savons en injections intramusculaires et intraveineuses. Mais la nécessité d'obtenir une solution isotonique, aussi peu hémolytique que possible et neutre, pose de très sérieuses difficultés, les savons des acides de Chaulmoogra étant nettement alcalins. De nombreuses formules ont été expérimentées et l'on trouvera à ce sujet dans le Bulletin de la Société Médico-chirurgicale de l'Indochine une solide documentation réunie par le Pharmacien-Capitaine PEIRIER [92].

C - LES ESTERS ETHyliQUES

Néanmoins, il semble bien qu'aujourd'hui, ce soient les esters éthyliques des acides gras qui soient le plus couramment utilisés. Ceux-ci sont en effet liquides et peuvent par conséquent être employés directement. Ils présentent sur les savons l'avantage d'être neutres et de pouvoir être employés à l'état pur, alors qu'il était nécessaire d'utiliser les savons en solution, ce qui bien entendu, avait pour conséquence de diminuer l'activité du produit. Sur les glycérides, ils présentent l'avantage de rester fluides et de pouvoir être aisément obtenus neutres, de sorte qu'un traitement ultérieur n'est pas nécessaire.

Dès 1908, les Ets. BAYER préparent sous le nom d'"Antiléprol" un produit qui n'était autre que les esters éthyliques des acides gras retirés de l'huile de Chaulmoogra. Puis l'utilisation de ces esters se généralise rapidement et l'on employa même différents dérivés. A. BLOCH et N. BOUVELOT [16] utilisèrent par exemple des esters éthyliques iodés administrés sous forme de capsule par voie buccale. R. CHAUSSINAND, Chef du Service de la lèpre à l'Institut Pasteur [26] préconise l'injection intramusculaire des esters car selon lui "le Chaulmoogra donne les meilleurs résultats sous la forme d'esters éthyliques". Aussi l'utilisation des esters s'est-elle rapidement généralisée.

Ce même auteur faisant dans son excellent ouvrage, le point des connaissances acquises sur la lèpre, admet que l'action des sulfones et du Chaulmoogra sont vraisemblablement différentes. Le chaulmoogra attaquerait surtout l'enveloppe cirongraisseuse du germe, et le rendrait ainsi plus vulnérable aux réactions de défense de l'organisme alors que les sulfones agiraient comme bactériostatiques. Aussi préconise-t-il une médication mixte, qu'il considère comme synergique, et qui est probablement mieux supportée par les malades. Cette synergie serait particulièrement efficace chez les lépreux des types "tuberculoïdes" ou "indéterminés".

D'ailleurs, dès 1948, ROGERS [110] dont on sait la très grande expérience acquise aux Indes dans le traitement de la lèpre recommande également d'associer les deux médications ; selon lui, des résultats plus rapides et plus complets seront ainsi obtenus. Il semble bien que, dès 1949, le traitement mixte par l'association sulfone-chaulmoogra, suspension de sulfone dans les esters éthyliques, s'était déjà généralisé. En effet, R. MICHEL [77] consacre sa thèse à cette étude et rassemble une ample bibliographie concernant ce mode de traitement désormais classique de la lèpre.

L'on conçoit donc que les esters de Chaulmoogra constituent actuellement un médicament très utilisé. Dans son rapport de mission en A.O.F. [41], Mademoiselle M.Th. FRANCOIS consacre une longue étude à leur préparation et à leur utilisation par l'Institut Marchoux de Bamako. Si l'on emploie encore des mélanges à parties égales d'huile de Chaulmoogra et d'esters éthyliques, ce sont actuellement les suspensions de sulfone-mère dans les esters éthyliques de l'huile de Chaulmoogra ou de l'huile de Gorli qui sont le plus utilisées. Dès lors notre attention était attirée par l'intérêt qu'il y aurait à mettre au point une méthode simple permettant de préparer rapidement et avec un rendement satisfaisant les esters.

CHAPITRE II

LA PRÉPARATION DES ESTERS ÉTHyliQUES

A - LE MODE DE PREPARATION ACTUEL DES ESTERS

Les esters éthyliques sont actuellement préparés à partir des huiles de chaulmoogra, lesquelles sont soumises à l'alcoolyse par le procédé classique de HALLER [53], spécialement adapté à la matière première par COLE et CARDOSO [30]. Le principe de la méthode est le suivant : on place dans un ballon de Pyrex de l'alcool à 99° contenant 1 % d'acide sulfurique pur à 66°B, et la matière première à estérifier. On abandonne pendant une nuit, puis on soumet à l'ébullition sous reflux pendant huit heures. Après refroidissement, on décante la couche inférieure, (acide sulfurique dilué) et on lave les esters obtenus pour éliminer toute trace d'acide et l'excès d'alcool, ainsi que le glycérol provenant de l'alcoolyse et qui est également entraîné par le lavage. Les esters bruts sont ensuite neutralisés au moyen de carbonate de sodium, puis, après un nouveau lavage, séchés sur du sulfate de sodium anhydre, enfin distillés sous vide en vue de leur rectification.

Cette méthode présente un certain nombre d'inconvénients, en particulier d'ordre économique. Elle nécessite en effet, que l'on porte à l'ébullition sous reflux durant 8 heures, le mélange à estérifier, ce qui se traduit par une consommation très importante de calories (la durée de l'opération semble d'ailleurs excessive car plusieurs essais nous ont révélé qu'en utilisant le mode opératoire proposé, la totalité des glycérides étaient transformés en esters éthyliques après 2 heures d'ébullition). Néanmoins la méthode est recommandable lorsqu'on désire préparer les esters à partir de l'huile de chaulmoogra proprement dite.

Si au contraire l'on ne dispose que des graines oléagineuses (et depuis que l'Afrique utilise les huiles de ses propres espèces productrices, la matière première n'est plus l'huile elle-même importée des Indes, mais précisément les graines récoltés dans les plantations africaines), cette méthode exige, avant sa mise en œuvre, une extraction préalable des lipides, en d'autres termes une nouvelle et importante dépense en calories et en solvant.

C'est pourquoi, nous avons pensé qu'il était possible de préparer directement des esters chaulmoogriques à partir des graines oléagineuses elles-mêmes, en une opération unique, grâce au procédé d'extraction par l'éthanol bouillant, dont la description détaillée vient de faire l'objet du Titre I de cette troisième partie. Au cours de cette extraction, on obtient en effet directement un miscella constitué essentiellement par les lipides en solution ou en suspension (selon le degré de concentration) dans l'éthanol bouillant. En d'autres termes, dans le ballon de l'extracteur, se trouvent réunies toutes les conditions nécessaires à l'alcoolyse des lipides à l'exception d'une seule : la présence du catalyseur. En plaçant dans ce ballon une certaine quantité d'acide sulfurique avant la mise en route de l'extraction, on devrait obtenir directement en fin d'opération, non plus les lipides, mais bien les esters correspondants.

L'expérimentation entreprise afin de vérifier cette hypothèse a pleinement répondu à cette attente : en effet, nous avons obtenu ainsi très simplement les esters avec un rendement pratiquement quantitatif et par la suite, cette méthode a toujours été utilisée pour préparer les esters des différentes espèces examinées. Voici comment nous avons procédé :

1 - EXTRACTION ET ESTERIFICATION -

Dans une première expérience, nous avons reproduit les conditions opératoires proposées par COLE et CARDOSO en utilisant les graines de Caloncoba echinata. La capacité de l'extracteur est remplie de la matière première finement broyée tandis que le ballon contient 1 litre d'éthanol à 99° et 10 ml d'acide sulfurique pur à 66°. On porte alors le solvant à ébullition et on laisse l'extraction se poursuivre durant le temps nécessaire pour extraire la totalité des lipides de la graine oléagineuse.

Plusieurs indices révèlent que l'estérification s'est effectuée au fur et à mesure de l'extraction : on remarque d'abord que le miscella reste parfaitement limpide durant toute la durée de l'opération, ce qui révèle une teneur faible ou nulle en glycérides : nous avons vu en effet que ceux-ci précipitent au sein du solvant bouillant à partir d'une certaine concentration. Par contre, les esters éthyliques très solubles dans l'éthanol, ne donnent lieu à aucune précipitation. D'autre part, le miscella limpide est beaucoup plus fortement coloré que lors de l'extraction simple en l'absence d'acide sulfurique : il affecte au bout de quelques heures une intense coloration brun-noire que nous avons attribuée à l'action de l'acide sulfurique sur les divers constituants non lipidiques présents dans le miscella (voir page 68) et notamment les sucres.

Au cours du refroidissement aucune précipitation ne se produit et la solution reste parfaitement limpide ce qui prouve l'absence de glycérides au sein du miscella. Cette solution contient donc les esters, le glycérol primitivement combiné aux acides gras et libéré lors de l'alcoololyse, l'acide sulfurique, l'ensemble des constituants non lipidiques du tourteau, solubles dans l'éthanol et plus ou moins altérés par l'action du catalyseur acide, le tout en solution dans un excès d'éthanol. Il était alors nécessaire d'extraire de ce mélange dans les meilleures conditions possibles, les esters éthyliques.

2 - SEPARATION ET PURIFICATION -

Nous procédons à l'extraction des esters de la façon suivante : le miscella est additionnée de bicarbonate de sodium par petites quantités, jusqu'à cessation totale de l'effervescence et neutralité du papier de tournesol. L'excès d'acide sulfurique est ainsi neutralisé. On dilue ensuite la solution par deux fois son volume d'eau ; un louche apparaît aussitôt et l'on porte le tout dans une ampoule à décantation ; les esters se séparent et viennent surnager en surface, sous la forme d'un liquide huileux, plus ou moins coloré, et d'odeur caractéristique. L'on peut alors reprendre la couche surnageante par de l'éther de pétrole : les esters éthyliques s'y dissolvent en totalité et l'on sépare cette solution. Après élimination du solvant selon la méthode habituelle on obtient les esters bruts. Ce procédé présente l'avantage de permettre la récupération de la totalité des esters contenus dans le miscella. Mais l'on peut tout aussi bien séparer directement la couche surnageante sans utiliser un solvant intermédiaire, ce qui simplifie le processus et donne également d'excellents résultats.

Les esters bruts ainsi obtenus ne sont pas purs et présentent généralement une coloration brune désagréable. Ils peuvent également posséder encore une légère acidité et notamment si l'on a pas pris soin de neutraliser totalement le miscella par le bicarbonate de sodium. Si donc on constatait un indice d'acide relativement élevé (supérieur à 2) (ce qui n'a d'ailleurs jamais été le cas dans

nos expériences), il serait nécessaire de procéder à la neutralisation de ces esters bruts soit par du bicarbonate de sodium, soit par du carbonate de calcium, puis d'entraîner les savons formés par lavage à l'eau distillée et enfin de sécher les esters bruts neutralisés sur sulfate de sodium anhydre.

Les méthodes de purification des esters varieront selon le but que l'on se propose d'atteindre. Si l'on désire enrichir les esters en acides cyclopenténiques optiquement actifs, il suffira de distiller les esters bruts et d'éliminer les fractions de tête qui contiennent, comme nous le verrons (page 81) l'acide linéaire en C 16 (acide palmitique). Si l'on désire au contraire obtenir la totalité des esters éthyliques formés, la distillation ne s'impose plus. Il suffit en ce cas de procéder à la décoloration des esters bruts par passage sur charbon activé. Plusieurs passages sont nécessaires pour obtenir une décoloration totale : ces opérations entraînent malheureusement de légères pertes qu'il est impossible d'éviter. On obtient finalement un produit limpide, jaune très clair, d'odeur caractéristique et agréable, d'indice d'acide nul, que l'on peut utiliser directement en thérapeutique.

La solution hydroalcoolique diluée sera de son côté soigneusement recueillie en vue de la récupération de l'éthanol.

3 - RENDEMENT EN ESTERS -

Nous avons obtenu pour 100 g de graines de Caloncoba echinata 48 g d'esters bruts, alors que lors de l'extraction des lipides par l'éthanol, nous n'avions obtenu que 45 g de glycérides précipités (seuls utilisables en thérapeutique) et seulement 46,7 g de lipides totaux.

Le rendement en esters bruts est donc supérieur, et ceci pour les raisons suivantes : il est plus élevé que le rendement en glycérides neutres précipités, parce que l'estérification porte à la fois sur les glycérides neutres, qui subissent l'éthanololyse et sur les acides gras libres qui sont parallèlement estérifiés. Mais il est également plus élevé que le rendement en lipides totaux car le poids de l'éthanol combiné aux acides gras pour constituer les esters est légèrement plus élevé que le poids de glycérol combiné à ces mêmes acides gras pour constituer les glycérides : il en résulte que le poids d'esters, obtenu par extraction totale est toujours supérieur au poids des glycérides correspondants. Pour ce même motif d'ailleurs, les valeurs de l'indice d'iode et de la déviation polarimétrique des esters sont inférieures à celles des glycérides.

Le rendement sera évidemment proportionnel au temps d'extraction, puisque l'estérification se fait au fur et à mesure de l'entraînement des lipides au sein du ballon. Il peut donc être déterminé grâce aux courbes établies dans un précédent chapitre (voir Titre 1, chapitre 5). Tout ce qui a été dit quant à la cinétique de l'extraction peut évidemment s'appliquer ici et l'on aura donc intérêt à se reporter à cette étude.

4 - NOUVELLE AMELIORATION DE LA METHODE -

Mais avant de généraliser ces résultats, nous avons tenté d'améliorer la méthode d'extraction en substituant à l'alcool à 99° l'alcool à 96° (azéotrope) d'usage beaucoup plus courant et de prix de revient bien inférieur.

Nous avons donc mené dans des conditions rigoureusement identiques à celles qui viennent d'être décrites, une seconde extraction mais en utilisant cette fois de l'alcool à 96°. Nous nous sommes heurtés à une difficulté inattendue lorsqu'il a fallu séparer dans la boule à décanter les esters et la solution hydroalcoolique. La couche supérieure qui doit correspondre aux esters éthyliques s'est, en effet, partiellement solidifiée et a laissé précipiter un beurre dense et homogène en son sein. Soumis à la distillation, les constituants de cette couche surnageante se séparent à nouveau en deux fractions l'une distillant et qui correspond aux esters éthyliques formés, l'autre non distillable et qui se solidifie

par refroidissement dans le ballon à distiller : celle-ci correspond à des glycérides qui n'ont pas été estérifiés par l'éthanol. "

Il est d'ailleurs facile d'interpréter ce phénomène : au cours de l'estérification, l'acide sulfurique joue le rôle d'un déshydratant : si l'on diminue le titre de l'alcool en utilisant un alcool à 96° au lieu d'un alcool à 99° on augmente la teneur en eau du mélange et l'on contrarie par là même l'action de catalyseur. Il doit donc être nécessaire pour obtenir une estérification totale dans ces conditions, d'augmenter le taux en acide sulfurique de la phase alcoolique. C'est ce que nous avons vérifié en effectuant à nouveau 4 extractions dans des conditions identiques à celles qui viennent d'être décrites en utilisant toujours l'alcool à 96° ; seul varie le taux de catalyseur dans chaque ballon, allant de 15 ml d'acide sulfurique par litre d'éthanol à 30 ml. Au terme de ces essais, il apparaît que l'estérification est complète dans les ballons contenant 25 et 30 ml d'acide par litre d'éthanol. Dans ces deux cas, nous n'avons observé, ni précipitation au sein de la couche supérieure correspondant aux esters, ni résidu notable à la distillation. L'augmentation du taux d'acide sulfurique compense donc la diminution du titre de l'éthanol.

Il est donc possible de préparer directement les esters éthyliques à partir des graines oléagineuses, en utilisant la méthode qui vient d'être décrite et en employant de l'alcool à 96°. Il suffit pour rendre l'estérification quantitative, d'ajouter à l'éthanol 2, 5 à 3 % d'acide sulfurique pur. Dans ce cas, le rendement est total et la méthode donne d'excellents résultats.

C - CONCLUSIONS

Cette méthode permet donc de préparer directement des esters à partir des graines oléagineuses, sans qu'il soit nécessaire d'extraire l'huile au préalable. Nous l'avons également utilisée avec succès pour la préparation des esters de Caloncoba Welwitschii. Elle constitue un prolongement et une application directe de la méthode d'extraction par l'éthanol bouillant, qui a été longuement étudiée précédemment. Etant donné son intérêt, elle a fait l'objet d'une demande de brevet français par le CNRS. Nous l'avons également utilisée pour la fabrication des esters des acides gras du Ricin (1). Les résultats obtenus ont été d'autant plus satisfaisants que les glycérides du ricin, contenant près de 80 % d'acide ricinoléique, sont très solubles dans l'éthanol. L'extraction a donc été très rapide, et le rendement en esters très élevé, pour des temps d'extraction relativement brefs.

Ainsi se trouvent résolus un certain nombre de problèmes que nous nous étions proposés de résoudre en entreprenant ce travail et concernant la préparation d'huiles de chaulmoogra neutres et de leurs esters destinés à l'usage thérapeutique. Pour cela l'utilisation de l'éthanol semble parfaitement indiquée.

Cependant l'éthanol ne s'est pas révélé un solvant sélectif vraiment efficace à l'égard des différents types de glycérides. S'il dissout préférentiellement les glycérides riches en acide gorlique comme cela a pu être vérifié précédemment, ce pouvoir sélectif est très insuffisant et ne permet pas de séparer quantitativement la totalité des glycérides liquides par cette méthode. On ne peut espérer obtenir ainsi des produits de haut indice d'iode dans des conditions de rendement acceptables. Or nous avons vu que l'acide gorlique peut être considéré comme un des éléments les plus actifs de l'huile. Il convient donc de rechercher maintenant une méthode qui permette d'obtenir rapidement des fractions riches en acide gorlique, en vue de leur expérimentation clinique, et éventuellement de leur utilisation médicale.

(1) non publiée.

QUATRIÈME PARTIE

LA PRÉPARATION DES DÉRIVÉS RICHES EN ACIDE GORLIQUE

CHAPITRE I

LES MÉTHODES UTILISÉES POUR L'EXTRACTION DE L'ACIDE GORLIQUE

Plusieurs méthodes ont été indiquées jusqu'à ce jour pour la préparation de l'acide gorlique. Mais les auteurs qui les utilisèrent étaient dépourvus de toute préoccupation économique et thérapeutique : il ne s'agissait pas pour eux de proposer le mode de fabrication d'un médicament nouveau, dans des conditions telles que son utilisation ultérieure puisse être envisagée, mais bien plutôt de préparer l'acide gorlique en vue d'en déterminer les caractéristiques physiques et les propriétés chimiques, et de donner ainsi la description d'un nouveau principe immédiat. Nous nous contenterons, à titre indicatif, de résumer ici les méthodes utilisées pour son extraction.

D. JOUATTE [58] a procédé de la manière suivante ; il sépare tout d'abord les glycérides solides des glycérides liquides en opérant plusieurs cristallisations, dans différents solvants. Puis les glycérides liquides (indice d'iode = 108) sont saponifiés, les acides gras extraits par la méthode habituelle, et soumis à la cristallisation à plusieurs reprises dans de l'alcool à 90°, afin d'éliminer une bonne partie des acides solides qu'ils contiennent encore. Les acides liquides bruts ainsi obtenus représentant environ le tiers des acides totaux des glycérides liquides sont alors estérifiés par l'éthanol. Les esters éthyliques sont rectifiés par distillation. Les têtes de distillation sont éliminées, ayant un indice d'iode relativement faible. De nombreuses distillations sont nécessaires, qui permettent d'obtenir, en définitive, des esters éthyliques ayant un indice d'iode de 150, en faible quantité. Ceux-ci sont enfin saponifiés, et les acides gras extraits contiennent 85 % d'acide gorlique environ. La méthode bien entendu n'est pas quantitative.

Les autres méthodes utilisées s'inspirent des mêmes principes et nécessitent également un très grand nombre de cristallisations fractionnées et de distillations fractionnées. COLE et CARDOSO [30] simplifient légèrement la méthode de JOUATTE : ils extraient immédiatement les acides gras par quatre cristallisations successives dans l'éthanol à 80° puis préparent les esters correspondants et effectuent 7 distillations successives pour obtenir finalement du gorlate d'éthyle pratiquement pur. PAJET [87] ne semble pas apporter d'innovation originale à cette méthode pas plus d'ailleurs que WRENSHALL et DEAN [126]. Tous ces auteurs ont pu obtenir de faibles quantités d'acide gorlique, en combinant différentes méthodes de séparation classique et en enrichissant les produits obtenus en opérant des cristallisations ou des distillations maintes fois répétées.

On obtient, en définitive, de l'acide gorlique en très faibles quantités, qui ne permettent pas d'entreprendre une expérimentation thérapeutique prolongée. Par surcroît, le produit obtenu ne peut être considéré comme un médicament, son prix de revient étant prohibitif.

Nous avons donc entrepris une étude systématique et comparative des différentes méthodes susceptibles de permettre l'obtention de produits riches en acide gorlique, en nous basant sur les récents progrès de la chimie des corps gras. Ce travail a porté successivement sur les esters, puis sur les glycérides, enfin sur les acides gras eux-mêmes et nous pouvons finalement proposer une méthode simple d'obtention d'acide gorlique presque pur, avec un rendement acceptable, résultat d'ailleurs que nous n'osions espérer en entreprenant cette étude. La matière première utilisée était toujours les huiles de Caloncoba echinata et de Caloncoba Welwitschii du Gabon, espèces dont nous possédions des stocks de graines importants.

CHAPITRE II

FRACTIONNEMENT DES ESTERS ÉTHyliQUES PAR DISTILLATION

Ayant à notre disposition une méthode simple et rapide pour la préparation des esters éthyliques, il était tentant de leur faire subir une distillation fractionnée en vue d'explorer la possibilité éventuelle de séparer par cette méthode le gorlate d'éthyle des autres esters éthyliques correspondant aux acides gras du mélange (chaulmoograte d'éthyle, palmitate d'éthyle, oléate d'éthyle). Cependant les poids moléculaires des deux principaux acides gras étant presque identiques (acide chaulmoogrique = 280 ; acide gorlique = 278), et le point d'ébullition de leurs esters très voisin (chaulmoograte d'éthyle : PE (10 mm) = 206° [31] ; gorlate d'éthyle PE (15 mm) = 226° [30]), les chances de succès d'une telle méthode étaient, dès l'abord, très limitées. D. JOUATTE n'avait d'ailleurs pas obtenu un fractionnement satisfaisant par cette méthode, mais il opérait, il est vrai, sous un vide peu poussé fourni par une simple trompe à eau (13 mm environ).

Nous avons procédé de la façon suivante : les esters bruts (indice d'iode = 88,4) obtenus à partir des graines de Caloncoba Welwitschii par la méthode indiquée plus haut, sont placés dans un ballon à fond rond que surmonte une longue colonne de Vigreux. La colonne est en communication par sa partie supérieure avec un réfrigérant, puis avec un collecteur de fractions du type "Delaby et Charonnat", permettant la séparation des fractions obtenues sans interrompre la distillation. Le collecteur de fractions est lui-même en relation, par l'intermédiaire d'un flacon de sécurité, plongeant dans un mélange réfrigérant et destiné à retenir les vapeurs qui pourraient ne pas s'être condensées dans le premier réfrigérant, puis d'un manomètre à mercure, avec une pompe à huile permettant d'obtenir un vide de 1 mm de mercure. Un courant d'azote est dirigé dans le liquide par l'intermédiaire d'un très mince tube capillaire, et le ballon est chauffé ; les esters distillent, puis se condensent dans le réfrigérant et sont recueillis dans le collecteur de fraction. Chaque fraction est séparée et on détermine son indice d'iode qui permet de suivre les effets du fractionnement et l'enrichissement éventuel des fractions en acide gorlique. Les résultats obtenus figurent au tableau n° 21.

L'étude de ce tableau montre que la distillation est régulière, mais que la séparation obtenue est très insuffisante. Certes, les fractions s'appauvrissent régulièrement en acide palmitique et s'enrichissent en acide gorlique, mais dans des proportions relativement très faibles. La quasi totalité des esters palmitiques est passée avant la fraction n° 5, ce qui se manifeste par l'élévation brusque de la température (de 158 à 170°C) et de l'indice d'iode (de 85,3 à 89,9). L'acide palmitique ne possédant que 16 atomes de carbone est en effet plus volatil que les acides gras en C 18. C'est ensuite un mélange des esters chaulmoogrique et gorlique qui distille, mélange qui d'ailleurs s'enrichit régulièrement en ester gorlique. Les fractions 11 et 12 sont légèrement colorées et leur indice d'iode tend à diminuer : ce phénomène est tout à fait général ; sans doute doit-il être

attribué au fait que les produits ayant subi une longue surchauffe ont été partiellement oxydés ce qui explique à la fois la chute de l'indice d'iode et l'apparition d'une légère coloration jaune.

Tableau n° 21

Distillation des esters éthyliques de Caloncoba Welwitschii
(Pression : 1 mm de mercure)

N° des fractions	Température	Volume obtenu (ml)	Indice d'iode
1	152-156	20	80,3
2	156-157	11	81,4
3	157-158	11	82,5
4	158-163	11	85,3
5	163-170	11	89,9
6	170-173	11	91,9
7	173-177	11	94,3
8	177-181	11	96,3
9	181-184	11	98
10	184-187	11	99,8
11	187-193	11	97,8
12	193-197	4	97
13	résidu pyrogéné	9	97,3

On sépare les fractions 1 à 4 éliminant ainsi la plus grosse partie de l'acide palmitique, puis les fractions 5 à 12 sont à nouveau mélangées et on soumet ce mélange à une nouvelle distillation fractionnée en vue de séparer cette fois les esters chaulmoogriques des esters gorliques. Les résultats obtenus à l'issue de cette seconde distillation figurent au tableau n° 22.

Il semble qu'on ait atteint la limite du pouvoir séparateur par la simple distillation des esters : en effet, les quatre dernières fractions qui possèdent des indices d'iode très voisins semblent être de constitution chimique presque identique, de sorte que cette seconde distillation fractionnée n'a pas permis de dépasser une teneur de 20 % en acide gorlique (1), ce qui constitue à vrai dire un résultat médiocre.

Espérant pouvoir améliorer au moins légèrement ce chiffre, les fractions 4 à 8 sont à nouveau mélangées et redistillées (tableau n° 23).

(1) Il est facile de déterminer la teneur en gorlate d'éthyle de ces fractions par les méthodes classiques de l'analyse des lipides. Elles sont en effet, constituées d'un mélange binaire ne contenant que le chaulmoograte d'éthyle (indice d'iode théorique = $254 : 308 = 82,8$) et du gorlate d'éthyle (indice d'iode théorique = $508 : 306 = 166$). Connaissant l'indice d'iode d'une fraction soit par exemple 99,8 (fraction n° 10) il est aisé de calculer sa composition chimique soit $\frac{100 \times (99,8 - 82,8)}{166 - 82,8} = 20,4$ % de gorlate d'éthyle et par conséquent 79,6 % de chaulmoograte d'éthyle. Remarquons que les traces d'oléate d'éthyle contenus dans le mélange n'influent nullement sur ce calcul, car l'indice d'iode théorique de cet ester est identique à celui de chaulmoograte d'éthyle. On peut donc ainsi déterminer la constitution chimique de tout mélange ne comprenant que les esters chaulmoogrique et oléique d'une part, gorlique d'autre part. C'est toujours par cette méthode que nous déterminons, dans les pages qui vont suivre, le taux d'acide gorlique dans les différentes fractions.

Tableau n° 22

Première distillation des esters enrichis en acide gorlique
(Pression : 1 mm de mercure)

N° des fractions	Température	Volume obtenu (ml)	Indice d'iode
1	154-162	11	84,8
2	162-176	11	88,4
3	176-185	11	91,1
4	185-190	11	93,7
5	190-198	12	97,4
6	198-202	11	99,5
7	202	10	99,9
8	202	6	99,6
9	résidu pyrogéné	4	95,6

Tableau n° 23

Deuxième distillation des esters enrichis en acide gorlique
(Pression : 1,2 mm de mercure)

N° des fractions	Température	Volume obtenu (ml)	Indice d'iode
1	185-192	9	92,9
2	192-196	9	97,8
3	196-197	9	100,2
4	197-198	9	100,7
5	198	4	100,4
6	résidu pyrogéné	2	90,1

La première fraction est séparée, puis les fractions 2 à 5 sont à nouveau mélangées et distillées (tableau n° 24).

Tableau n° 24

Troisième distillation des esters enrichis en acide gorlique
(Pression : 1,2 mm de mercure)

N° des fractions	Température	Volume obtenu (ml)	Indice d'iode
1	195	8	100,9
2	195-196	8	100,7
3	196	8	100,9
4	197	4	100,8
5	résidu pyrogéné	2,5	94,7

Il suffit d'examiner les résultats des tableaux n° 23 et n° 24, pour constater que la simple distillation ne permet pas la séparation des constituants d'un mélange contenant environ 20 % de gorlate d'éthyle et 80 % de chaulmoograte d'éthyle. Il n'est donc pas possible d'obtenir ainsi, par simple distillation des esters éthyliques bruts, du gorlate d'éthyle pur. Cette opération serait peut-être possible après séparation préalable de la plus grosse partie du chaulmoograte par cristal-

lisation fractionnée. Mais nous retombons alors sur la méthode préconisée et pratiquée par COLE et CARDOSO [30].

Des essais identiques ont été effectués avec les esters bruts de Gorli. Les résultats n'ont pas été plus favorables et il ne semble pas nécessaire de les relater ici.

Par contre, cette méthode permet d'éliminer, au moins partiellement, l'acide palmitique sous forme de palmitate d'éthyle. JOUATTE [50] a montré en effet, qu'il suffit pour cela, de redistiller plusieurs fois les fractions de tête, selon une méthode rigoureusement analogue à celle que nous venons d'indiquer pour les fractions de queue : l'on voit l'indice d'iode s'abaisser régulièrement. De même en distillant très lentement les esters bruts, on observe que les premières fractions ont des indices d'iode beaucoup plus faibles que ceux trouvés ci-dessus, lorsque la distillation était relativement rapide. Ainsi avec les esters bruts de *Caloncoba echinata*, nous avons pu obtenir, en effectuant une distillation très lente les résultats suivants : (tableau n° 25).

Tableau n° 25

Distillation lente des esters de *Caloncoba echinata*
(Pression : 1 mm de mercure)

N° des fractions	Poids (g)	Indice d'iode	Déviation polarimétrique
1	6,2	57,8	27° 15'
2	11,7	72,4	36° 40'
3	19,7	80,6	42° 25'
4	31,7	90,0	49° 06'
5	34,7	95,1	51° 56'
6	19,2	96,4	52° 06'
7	16,8	96,5	52° 16'
résidu pyrogéné	12,6	94,6	52°

Cetableau met en évidence la possibilité de séparer, dans d'assez bonnes conditions, l'ester de l'acide palmitique (dont le poids moléculaire est beaucoup plus bas) des esters d'acides cyclopenténiques, alors qu'au contraire la séparation de ces derniers (chaulmoograte et gorlate d'éthyle) nous venons de le constater, est impossible par cette seule méthode.

Nous avons alors abandonné les esters, afin de poursuivre sur les glycérides nos efforts de fractionnement.

CHAPITRE III

SÉPARATION DES GLYCÉRIDES PAR CRISTALLISATION FRACTIONNÉES ET ESSAIS DE TRANSESTÉRIFICATION DIRIGÉE

A - CRISTALLISATION FRACTIONNÉE DES GLYCERIDES

1 - CONSTITUTION THEORIQUE DU "BEURRE DE GORLI" -

Pour des motifs que nous allons maintenant étudier et qui tiennent à la constitution même des lipides, on ne peut espérer obtenir, en soumettant les glycérides naturels à la simple cristallisation fractionnée, des produits contenant beaucoup plus de 33 % d'acide gorlique. Pour en comprendre la raison, il est nécessaire de consacrer quelques instants à l'étude de la constitution chimique des glycérides du Chaulmoogra.

Les analyses quantitatives effectuées par COLE et CARDOSO sur l'huile de Caloncoba echinata [29] et par S. GIL QUINZA et P. RIBOSA ARNO sur l'huile de Caloncoba Welwitschii [47] indiquent, pour ces lipides, des teneurs en acides gras sensiblement du même ordre soit :

acide chaulmoogrique : 70 à 75 % ;
acide palmitique : 6 à 8 % ;
acide gorlique : 10 à 15 % ;
acide oléique : 1 à 3 %.

Ces huiles contiennent en outre, mais seulement à l'état de traces, les homologues inférieurs de l'acide chaulmoogrique, décrits par COLE et CARDOSO [28] (acide aléprique, aléprylique, aléprestique et aléprolique). Enfin, elles sont dépourvues d'acide hydnocarpique.

L'estérification des acides gras et du glycérol se produisant au hasard, au cours de la biosynthèse des glycérides dans la graine oléagineuse, il suffit de considérer les valeurs précédentes pour en déduire la constitution probable des glycérides. En effet si l'on admet avec COLE et CARDOSO, qu'une huile de Gorli contient 75 % d'acide chaulmoogrique, 15 % d'acide gorlique, 8 % d'acide palmitique et 2 % d'acide oléique, il suffit d'effectuer le simple calcul de la distribution théorique des acides gras sur le glycérol pour connaître le nombre et la nature des triglycérides du mélange ainsi que leurs proportions respectives, en admettant toutefois les trois hypothèses suivantes :

- les trois acides gras se combinent de façon ternaire avec le glycérol.

- la combinaison est totale et il ne reste plus de molécules libres à la fin de l'estérification (on ne tient pas compte des acides gras libres qui sont en très faibles proportions par rapport aux glycérides).

- enfin la combinaison est aléatoire et se produit au hasard des rencontres des molécules. Il n'y a pas superposition de réactions différentes à des

vitesse différentes, favorisant l'élaboration préférentielle de certaines combinaisons.

La constitution probable d'un tel mélange a été ainsi calculée, et figure au tableau 26.

Tableau n° 26

Constitution probable d'une huile de Gorli

N°	Constitution des glycérides					Dénomination des glycérides	Probabilité en %
	Glycérol	Acide chaul.	Acide gorl.	Acide palm.	Acide ol.		
1	1	3				Trichaulmoogride	42, 1875
2	1		3			Trigorlide	00, 3375
3	1			3		Tripalmitide	00, 0512
4	1				3	Trioléide	00, 0008
5	1	2	1			Dichaulmoogromonogorlide	25, 3125
6	1	2		1		Dichaulmoogromonopalmitide	13, 5000
7	1	2			1	Dichaulmoogromonooléide	03, 3750
8	1	1	2			Digorlomonochaulmoogride	05, 0625
9	1		2	1		Digorlomonopalmitide	00, 5400
10	1		2		1	Digorlomonooléide	00, 1350
11	1	1		2		Dipalmitomonochaulmoogride	01, 4400
12	1		1	2		Dipalmitomonogorlide	00, 2880
13	1			2	1	Dipalmitomonooléide	00, 0384
14	1	1			2	Dioléomonochaulmoogride	00, 0900
15	1		1		2	Dioléomonogorlide	00, 0180
16	1			1	2	Dioléomonopalmitide	00, 0096
17	1	1	1	1		Monochaulmoogrogorlopalmite	05, 4000
18	1	1	1		1	Monochaulmoogrogorlooléide	01, 3500
19	1	1		1	1	Monochaulmoogropalmitooléide	00, 7200
20	1		1	1	1	Monogorlopalmiteooléide	00, 1440
Glycérides neutres :							100, 0000

L'examen de ce tableau révèle que 20 combinaisons peuvent être obtenues (on ne tient pas compte ici des arrangements, c'est-à-dire des isomères possibles du même glycéride, car ces isomères ont des indices d'iode et des déviations polarimétriques identiques). Parmi ces 20 combinaisons, 12 ont une probabilité inférieure à 1 % et 5 seulement ont une probabilité supérieure à 5 %. En fait le mélange est constitué à raison de plus de 80 % par trois glycérides seulement : trichaulmoogride très abondant, puis dichaulmoogromonogorlide, enfin dichaulmoogromonopalmitide. Il en résulte qu'au cours d'une cristallisation fractionnée, les glycérides les plus solubles auront un indice d'iode qui ne dépassera jamais sensiblement celui d'un mélange contenant environ 80 % de dichaulmoogromonogorlide, et 20 % de digorlomonochaulmoogride, soit un indice d'iode approximatif de 120. En effet, les glycérides qui pourraient contribuer à augmenter cet indice d'iode (tri et digorlides) se trouvent dans le mélange en proportions si faibles que l'on peut les considérer comme négligeables.

Il serait donc déraisonnable d'espérer obtenir, par la seule cristallisation fractionnée, des fractions glycéridiques possédant un très haut indice d'iode : quel que soit le degré de fractionnement auquel on parvienne et les qualités sélectives du solvant que l'on utilise, les glycérides liquides finalement obtenus, contiendront toujours plus d'acide chaulmoogrique que d'acide gorlique. Cette constatation enlève à la méthode une grande partie de son intérêt, et on ne peut espérer atteindre par là le but recherché, à savoir l'obtention de produits très riches en acide gorlique. Il est par surcroît très peu probable que puisse être atteint un indice d'iode de 120 ; en effet les glycérides liquides, au cours des opérations de cristallisation, retiennent toujours de petites quantités de glycé-

rides solides. Nous avons néanmoins procédé à la cristallisation fractionnée des glycérides, afin de déterminer le degré de fractionnement maximum susceptible d'être atteint par cette méthode.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus, nous nous sommes efforcé d'opérer toujours dans des conditions aussi semblables que possible, avec des solutions de concentrations identiques, soit 25 g de glycérides dissous dans 100 ml de solvant.

2 - CRISTALLISATION FRACTIONNEE DES GLYCERIDES DU BEURRE DE GORLI -

Les premiers essais de cristallisation fractionnée ont été effectués sur les glycérides du beurre de Gorli : l'opération a été menée simultanément sur trois solutions identiques ; les cristaux obtenus lors de chaque récolte sont essorés sur entonnoir de Büchner, puis redissous dans de l'éther de pétrole. Ces solutions sont ensuite distillées dans les conditions habituelles, afin d'éliminer le solvant, et l'indice d'iode des résidus lipidiques a été déterminé. Les conditions opératoires et les résultats figurent au tableau n° 27.

Tableau n° 27

Cristallisation fractionnée des glycérides de Gorli
(50 g dissous dans 200 ml d'éther de pétrole)

Conditions opératoires	n°	Solution A			Solution B			Solution C		
		Poids (g)	Consis- tance	Indice d'iode	Poids (g)	Consis- tance	Indice d'iode	Poids (g)	Consis- tance	Indice d'iode
2 h à 0°	1	23	solide	85,2	27	solide	88,2	26,5	solide	86,7
1 h à - 10°	2	6	"	94,6	7	"	92,8	8	"	95,4
2 h à - 18°	3	6	"	98,4	4	"	97,8	5	"	100,5
10 h à - 18°	4	3	pâteux	103,8	2	pâteux	105,5	2	pâteux	106,5
résidu non cristallisé	5	12	liquide	111,9	10	liquide	115,8	8,5	liquide	114,3

L'examen de ce tableau appelle les conclusions suivantes :

a) Bien que les trois opérations aient été menées simultanément et de façon aussi identique que possible, l'allure générale de la cristallisation n'est pas tout à fait analogue dans les trois essais, ce qui, à vrai dire, ne doit pas étonner, car cette méthode reste empirique, et il n'existe pas de techniques générales normalisées suffisamment précises, pour qu'il soit possible d'obtenir des résultats rigoureusement identiques.

b) Les glycérides liquides obtenus, représentant en moyenne 20 % des glycérides totaux et possédant un indice d'iode de 115 environ, contiennent approximativement 30 % d'acide gorlique. Bien que cette valeur se rapproche beaucoup de l'indice théorique du dichaulmoogromogorlide (115,9), ces glycérides liquides sont en fait constitués par un mélange de plusieurs glycérides comme on peut s'en rendre compte en consultant le tableau n° 26. Remarquons aussi que les fractions précipitées contiennent également des proportions non négligeables d'acide gorlique, puisque les indices d'iode dépassent généralement 86,8, valeur théorique d'un glycéride possédant trois acides monoéthyléniques en C 18. Le fractionnement n'est donc pas rigoureux.

c) Le beurre de Gorli utilisé dans cette expérience avait subi un chauffage à 180° en atmosphère d'azote, en vue de le déshydrater soigneusement. Si l'on fait cristalliser une graisse qui n'a pas subi de traitement thermique préalable, on observe que la cristallisation est beaucoup plus rapide et apparaît presque immédiatement après que la solution-mère ait été portée au réfrigérateur. Mais par contre, le fractionnement est beaucoup moins efficace, la première fraction possédant un indice d'iode de 91 tandis que celui du résidu lipidi-

que ne dépasse pas 111, 7, comme permet de s'en rendre compte le tableau n° 28. Ainsi le traitement thermique semble avoir modifié les glycérides, soit en provoquant une transformation spontanée de leur structure (transestérification spontanée) ce qui est fort peu probable, soit en modifiant leur système cristallin et leurs propriétés physiques, ce qui est plus vraisemblable.

3 - CRISTALLISATION FRACTIONNEE DES LIPIDES DE CALONCOBA GLAUCA (CAMEROUN) ET DE CALONCOBA WELWITSCHII (GABON) -

Les glycérides de Caloncoba glauca du Cameroun et de Caloncoba Welwitschii du Gabon ont également subi une cristallisation fractionnée dans l'éther de pétrole. Les premiers ont fourni près de 70 % de glycérides liquides, contenant 28 % d'acide gorlique ; résultat extrêmement favorable, et qui fait de cette espèce une excellente source de glycérides à haut indice d'iode. Les seconds, au contraire, n'ont donné au cours de cette cristallisation que des glycérides pâteux, lesquels subissant une seconde cristallisation fractionnée ont fourni finalement 7 % de glycérides liquides. Ces résultats figurent au tableau n° 28.

Tableau n° 28

Cristallisation fractionnée des glycérides
(75 g dissous dans 300 ml d'éther de pétrole)

Espèces étudiées		Caloncoba echinata (Côte d'Ivoire)			Caloncoba glauca (Cameroun)			Caloncoba Welwitschii (Gabon)		
Conditions opératoires	n°	Poids (g)	Consistance	Indice d'iode	Poids (g)	Consistance	Indice d'iode	Poids (g)	Consistance	Indice d'iode
2 h à 0°	1	16	solide	91	9, 5	solide	93, 1	19	solide	85, 9
1 h à - 10°	2	18	"	93, 8	3	"	96	12, 7	"	90, 6
2 h à - 16°	3	13	"	95, 4	5	"	97, 2	13	"	92, 3
10 h à - 18°	4	16	"	96, 7	6	pâteux	101, 5	5, 2	"	95, 9
Résidu non cristallisé	5	12	liquide	111, 7	51, 5	liquide	112, 1	25, 1	pâteux	99, 8

4 - CONCLUSIONS -

La cristallisation directe des glycérides totaux permet donc d'obtenir des glycérides liquides, en majeure partie constitués par du dichaulmoogromonogorlide et qui contiennent 25 à 30 % environ d'acide gorlique. La comparaison des résultats obtenus pour trois espèces de Caloncoba examinées révèle que la quantité de glycérides liquides est d'autant plus élevée que le taux d'acide gorlique lui-même est plus fort. Mais il n'y a pas simple proportionalité et la teneur en glycérides liquides croît beaucoup plus vite que la teneur correspondante en acide gorlique ; en effet, une molécule de cet acide correspond en moyenne à une molécule de glycéride liquide laquelle contient en outre deux autres radicaux acides gras. On conçoit donc que la proportion en glycérides augmente beaucoup plus rapidement, puisqu'une partie d'acide gorlique conduit à près de trois parties de glycérides liquides. Ceci explique les taux très différents en glycérides liquides des trois espèces étudiées.

Ainsi cette méthode permet-elle une séparation déjà plus efficace des produits ayant un indice d'iode élevé : elle marque donc un progrès certain sur la distillation directe des esters éthyliques totaux.

Cependant nous sommes encore bien éloigné du but proposé, à savoir l'obtention de produits à indice d'iode révélant une forte teneur en acides diéthyléniques et s'approchant d'une des valeurs suivantes :

- indice d'iode du gorlate d'éthyle = 166 ;
- indice d'iode du trigorlide = 174, 3 ;
- indice d'iode de l'acide gorlique = 182, 5.

Certes on ne pouvait attendre de cette méthode qu'elle permette d'obtenir des glycérides dioutrigorliques, puisque ceux-ci n'existent, selon toute probabilité, qu'en proportions négligeables dans les graisses naturelles. Les résultats obtenus correspondent bien aux prévisions établies, grâce à l'examen du tableau n° 26.

B - UTILISATION DES SOLVANTS SELECTIFS

L'on pourrait sans doute encore envisager l'utilisation de solvants sélectifs destinés à séparer les glycérides saturés et monoéthyléniques, des glycérides fortement éthyléniques. Dans ce but, le furfural est utilisé avec succès depuis quelques années pour le fractionnement de certaines huiles végétales [48-50-62], notamment les huiles siccatives telles que l'huile de lin dont il permet de séparer une fraction fortement éthylénique et par conséquent très siccative. Une expérimentation rapide nous a pourtant immédiatement fait renoncer à cette méthode. S'il a été possible de séparer ainsi le beurre de Gorli en deux fractions, l'une d'indice d'iode 105,2, l'autre de 92,1, la méthode présente par contre de sérieux inconvénients : elle n'est pas plus rapide que la cristallisation, et conduit, en définitive, à un fractionnement moins efficace ; de plus, le furfural bout à une température élevée et par conséquent les dernières traces de solvant sont très difficiles à éliminer. Enfin, ce solvant s'oxyde très rapidement en présence d'air, et doit être rectifié avant chaque usage. Son utilisation ne présente par conséquent aucun avantage sur la cristallisation fractionnée et ne permettrait pas de toute façon de séparer des glycérides liquides contenant plus de 25 à 30 % d'acide gorlique.

C - TRANSESTERIFICATION DIRIGEE DES GLYCERIDES DU GORLI

Il est maintenant nécessaire de poursuivre cette exploration systématique, en expérimentant des techniques plus récentes, telles que la transestérification dirigée.

1 - PRINCIPE DE LA METHODE -

En 1948, ECKEY [38] décrivait sous le nom de transestérification, une méthode entièrement nouvelle qui devait très rapidement connaître de multiples applications dans le domaine des corps gras. La transestérification consiste à modifier la répartition des chaînes d'acides gras sur les oxhydriles de la molécule de glycérol, grâce à l'action de catalyseurs divers (méthylate de sodium, oxydes alcalins). La transestérification pourra se faire au hasard : c'est ainsi que, par exemple, en mélangeant des glycérides de structures différentes et en additionnant le tout du catalyseur choisi à la température voulue, on constate que les radicaux acylés se distribuent sur le glycérol en fonction des lois de la probabilité et la répartition finale correspondra à la distribution théorique prévisible par le calcul. Mais s'il se forme des glycérides qui, en raison de leur point de fusion élevé par exemple, se séparent de la masse et s'éliminent du milieu réactionnel, l'équilibre de la réaction se trouve déplacé et on peut séparer certains constituants du mélange. Cette méthode a été appliquée à l'étude et au traitement de diverses matières premières et a permis de modifier les propriétés de celles-ci dans un sens favorable à leur utilisation (huiles siccatives notamment). Elle a permis par exemple de séparer de l'huile de palme, une quantité importante d'acide palmitique sous forme de tripalmitide, en utilisant le mode opératoire que nous décrivons ci-dessous.

2 - MODE OPERATOIRE UTILISE -

L'huile totalement déshydratée par chauffage à 200° dans une atmosphère de gaz inerte, est refroidie et ramenée à une température légèrement supé-

rieure à celle de son point de fusion. On ajoute alors le catalyseur en suspension dans le méthanol ou le xylène et à raison de 0,5 g environ de méthylate de sodium pour 100 g d'huile. Le mélange est agité continuellement, et très lentement refroidi (opération qui nécessite l'utilisation d'une enceinte calorifugée munie d'un thermostat). Des cristaux apparaissent lentement dans la masse qui s'opacifie. Après un temps variable, le mélange est brutalement additionné d'une solution diluée d'acide, afin de détruire le catalyseur. On arrête alors l'agitation et on réchauffe l'huile émulsionnée dans la solution acide diluée, laquelle vient nager à la surface. Elle est reprise par de l'éther de pétrole; la solution obtenue est séchée et mise à cristalliser à 4°C; le tripalmitide précipite; on le caractérise par son indice d'iode, qui est nul, et par son point de fusion. L'auteur obtient des résultats analogues avec l'huile de coton, le suif, le beurre de cacao, etc. Il conclue que la quantité de glycérides trisaturés obtenus dépend de la nature de la graisse, de la température à laquelle la cristallisation s'est produite et de la durée de l'opération.

3 - ESSAIS DE TRANSESTERIFICATION DU "BEURRE DE GORLI" -

Nous avons pratiqué cette méthode sur les huiles de Gorli. En réglant minutieusement la température de cristallisation, et en poursuivant l'opération durant un temps assez long, il devait être possible de séparer les glycérides solides. Puis, la température continuant à s'abaisser lentement, et les glycérides liquides arrivant à leur point de cristallisation, nous pensions pouvoir ainsi faire migrer les chaînes gorliques sur les mêmes molécules de glycérol, obtenant ainsi du trigorlide. Malheureusement, quelles qu'aient été les conditions opératoires mises en œuvre (température, durée de l'opération, qualité de l'huile utilisée, c'est-à-dire acidité, indice d'iode) les résultats de ces expériences ont toujours été négatifs. Aucune modification de la constitution chimique des glycérides du beurre de Gorli n'a pu être observée et nous n'avons pu mettre en évidence ni tripalmitide, ni trigorlide. En effet, la cristallisation fractionnée des huiles ayant subi des essais de transestérification, a conduit à des résultats sensiblement analogues à ceux qui avaient pu être obtenus avec les huiles naturelles et qui ont été indiqués précédemment. Il n'est pas nécessaire de reproduire ici le détail des expériences, toutes négatives, effectuées en des temps variant de deux heures à huit jours, à des températures fixes durant toute la transestérification ou, au contraire, s'abaissant lentement et régulièrement tout au long de l'opération, enfin avec des huiles parfaitement neutres ou légèrement acides.

Dans tous les cas, le mélange s'est lentement opacifié, mais les indices d'iode des fractions obtenues par cristallisation fractionnée dans l'éther de pétrole, dans des conditions identiques à celles indiquées plus haut, ont toujours été compris entre 83,5 et 115,5 prouvant manifestement l'absence de tripalmitide et de trigorlide.

Les proportions réciproques des différents acides gras sont en fait, très défavorables, les quantités d'acide palmitique et d'acide gorlique étant très faibles, comparées à l'importante proportion d'acide chaulmoogrique. Il était donc nécessaire de tenter une nouvelle opération, en modifiant artificiellement ces proportions.

Nous avons donc opéré sur un mélange de glycérides liquides d'indice d'iode = 107,6, ce qui correspondait approximativement à un mélange d'une partie d'acide gorlique pour 4 parties d'acide chaulmoogrique. Ce mélange est divisé en deux fractions, l'une servant de témoin, l'autre étant soumise à la transestérification. La température s'abaisse régulièrement durant 24 heures de 30° à 22°; après ce temps une partie de l'huile, encore fluide, est prélevée, le catalyseur détruit et l'huile extraite par de l'éther de pétrole. Après 4 jours, la température s'étant abaissée de 22° à 15°, un deuxième échantillon est prélevé dans les mêmes conditions et traité comme le précédent. Enfin, après 15 jours, la température s'étant lentement abaissée de 15 à 10°, l'opération est interrompue,

les lipides restant en expérience, presque solidifiés, sont prélevés et traités comme les échantillons précédents. Ces quatre échantillons, dont trois ont été traités durant des temps de plus en plus longs et à des températures de plus en plus basses afin de favoriser la formation et la précipitation de trichaulmoogride, (les di et trigorlides éventuellement formés restant liquides), sont soumis à une cristallisation fractionnée.

Tableau n° 29

Essais de transestérification dirigée des glycérides liquides d'huile de Gorli
(25 g dissous dans 50 ml d'éther de pétrole)

N° fractions	Témoin		Huile après 24 h		Huile après 4 jours		Huile après 15 jours	
	Poids (g)	Indice d'iode	Poids (g)	Indice d'iode	Poids (g)	Indice d'iode	Poids (g)	Indice d'iode
1	4,8	96,5	5	96,8	6,5	98,6	5	97,3
2	6,2	102,7	3,5	103,9	3,5	104,9	4,5	103,8
3	14	110,8	16,5	111,8	15	111,3	15,5	111,5
<u>Recristallisation des glycérides n° 3 dans l'éther de pétrole</u> (10 g dissous dans 20 ml d'éther de pétrole)								
A	3,5	106,5	2,3	107,7	2,5	106,5	3	107,1
B	1,5	110,9	2,6	110	1	111,5	2,2	110,8
C	5	112,9	5	113,2	6,5	112,1	4,8	113,4

Les résultats qui figurent au tableau n° 29 sont manifestement négatifs ; le traitement subi n'a aucunement transformé la structure chimique des glycérides. Les indices d'iode des différentes fractions sont très voisins, bien que chaque échantillon ait été traité de façon différente. Ainsi les acides cyclopenténiques semblent ne pas se comporter comme les acides linéaires. Dans ces conditions il paraît difficile d'obtenir, par transestérification, du trichaulmoogride et (le mélange étant binaire) du di ou trigorlide, toutes nos tentatives étant restées infructueuses.

Les motifs de cet échec restent problématiques ; on ne peut que formuler des hypothèses : les liaisons glycérol-acides cyclopenténiques sont-elles plus stables que les liaisons correspondantes glycérol-acide linéaire ? La teneur élevée des acides gras libres résultant de l'hydrolyse des glycérides, en acide palmitique, tendrait à justifier cette thèse. Mais il serait nécessaire pour la vérifier, de procéder à des saponifications fractionnées sur les glycérides totaux, et ceci pourra faire l'objet d'un travail ultérieur.

Quoi qu'il en soit, en raison de l'impossibilité d'obtenir, par transestérification dirigée, des glycérides di ou trigorliques, on ne peut espérer faire monter l'indice d'iode des fractions en continuant les efforts de fractionnement sur les glycérides. C'est donc finalement sur les acides gras qu'ont été poursuivis les essais de séparation de l'acide gorlique.

CHAPITRE IV

SÉPARATION DE L'ACIDE GORLIQUE A PARTIR DU MÉLANGE DES ACIDES GRAS DES HUILES DE CALONCOBA

A - DISCUSSION DES PRINCIPALES METHODES DE SEPARATION

De nombreuses méthodes ont été proposées pour la séparation des acides liquides non saturés, d'un mélange d'acides gras. Si dans la plupart des cas les acides saturés sont solides, alors que les acides éthyléniques sont liquides, remarquons immédiatement que, dans le cas des acides gras des huiles de Chaulmoogra, l'acide chaulmoogrique est solide, bien que sa molécule renferme une liaison éthylénique. Dans la série cyclopenténique, en effet, seuls les composés possédant deux liaisons doubles sont liquides (acide gorlique). Il s'agira donc de déterminer le comportement de l'acide chaulmoogrique au cours de différentes méthodes de séparation, dont toutes d'ailleurs n'ont pas la même valeur ou le même caractère de généralité.

Les acides gras totaux ont été préparés de la manière suivante : après saponification des glycérides par la potasse alcoolique, extraction des matières insaponifiables et décomposition de la solution savonneuse par une solution diluée d'acide chlorhydrique, les acides gras sont repris par de l'éther de pétrole. La solution obtenue est séchée sur du sulfate de sodium anhydre, puis le solvant est éliminé par distillation sous pression réduite en atmosphère d'azote. Les acides gras ainsi préparés se solidifient très rapidement par refroidissement ; leurs caractéristiques physiques et chimiques (point de fusion, indice d'iode, déviation polarimétrique) sont toujours plus élevées que celles des glycérides dont ils proviennent, par suite de l'élimination du glycérol qui diminuait l'indice d'iode et le pouvoir rotatoire des glycérides.

Les méthodes de séparation les plus couramment utilisées sont fondées sur les différences de solubilité des sels des acides liquides et des acides solides. La séparation des sels de plomb par la méthode de TWITCHELL [85] est la plus classique. Elle a été employée pour la séparation des acides liquides de l'huile de Chaulmoogra par WRENSHALL et DEAN [126], ainsi que par J. M. RAINERO [105] pour les acides du beurre de Gorli. Mais les résultats obtenus sont très insuffisants, et ce dernier auteur conclut : "cette séparation conduit à des résultats erronés, car le fractionnement est incomplet et les acides solides entraînent avec eux des quantités élevées d'acides liquides, comme il est montré par les résultats suivants obtenus avec l'une et l'autre portion, d'après la méthode de TWITCHELL :

- acides solides : indice d'iode = 81,5 ;

- acides liquides : indice d'iode = 119,3.

PAJET [87] n'obtint pas de meilleurs résultats en tentant de séparer les sels de cuivre et D. JOUATTE [58] dut renoncer à séparer l'acide gorlique en opérant des précipitations fractionnées au moyen de l'acétate de Baryum. Aussi KAUFFMAN [60] dans son traité sur les corps gras tout récemment publié, rejette-t-il ces

méthodes et précise qu'elles ne permettent pas une séparation suffisante des acides gras cyclopenténiques, de sorte que nous n'avons pas cru devoir poursuivre nos efforts dans cette direction.

Il était vraisemblable, à priori, que la distillation des acides comme celle des esters correspondants, ne permettrait pas de séparer l'acide gorlique de l'acide chaulmoogrique, ces deux acides ne différant que par une liaison éthylénique. Cette hypothèse a d'ailleurs été également vérifiée par D. JOUATTE [58].

Il ne reste plus alors que deux séries de méthodes : les premières fondées sur la cristallisation fractionnée des acides gras ou de certains de leurs dérivés, autres que les savons, les secondes sur la chromatographie.

Dans un travail récemment publié, KAUFFMAN et DESHPANDE [61] indiquent une méthode de séparation par chromatographie des constituants d'un mélange d'acide chaulmoogrique et hydnocarpique. Aucune autre méthode de séparation chromatographique des acides gras cyclopenténiques du Chaulmoogra ne semble avoir été publiée.

Nous avons d'abord décidé d'explorer les possibilités qu'offrent les méthodes fondées sur la cristallisation fractionnée, réservant les recherches chromatographiques comme ultime recours en cas d'échec. Plusieurs arguments ont motivé cette attitude : tout d'abord, la cristallisation s'inscrit mieux dans le cadre du travail effectué jusqu'ici ; ces méthodes, en outre, avaient permis d'obtenir, avec les glycérides, des résultats favorables ; enfin elles permettent d'opérer sur des quantités d'acides gras beaucoup plus élevées et on ne doit pas oublier que c'est en vue d'une expérimentation pharmacologique ultérieure et d'un éventuel emploi thérapeutique que s'effectue cette recherche. Il est donc nécessaire de pouvoir obtenir très rapidement des quantités importantes de produits.

B - SEPARATION DES ACIDES GRAS PAR CRISTALLISATION FRACTIONNEE

1 - ETUDE DU FRACTIONNEMENT DES ACIDES GRAS DU "BEURRE DE GORLI" -

Les acides gras ont d'abord subi une cristallisation dans l'acétone. Mais ils cristallisent très rapidement, de sorte qu'il est nécessaire d'opérer sur des solutions moins concentrées que celles utilisées lors de la cristallisation des glycérides : 75 g d'acides gras extraits du beurre de Gorli sont dissous dans 750 ml d'acétone. La solution est portée à -4°C . durant deux heures, puis après une première récolte de cristaux, à nouveau à -4° durant cette fois 2 jours. Après une deuxième récolte de cristaux, les eaux-mères sont portées à -18°C . On recueille une troisième fraction, après quoi les solutions sont soumises à la distillation en vue d'éliminer le solvant. On détermine l'indice d'iode de chaque fraction lipidique obtenue, puis les acides liquides sont à nouveau remis en solution, beaucoup plus concentrée cette fois, (10 g dans 20 ml d'acétone) pour favoriser une nouvelle précipitation, et portés 2 jours à -18° . On sépare une dernière série de cristaux, tandis que les acides restés en solution sont recueillis par distillation de la solution-mère ; on détermine l'indice d'iode de ces deux dernières fractions. Ces résultats figurent au tableau n° 30.

L'examen de ces résultats appelle les remarques suivantes :

a) l'indice d'iode des acides liquides est élevé, mais il est encore bien loin de correspondre à l'acide gorlique pur (indice d'iode = 182,5). Une deuxième cristallisation de ces acides liquides dans l'acétone enrichit encore cette fraction en acide diéthylénique : en effet, un indice de 141,3 correspond à une teneur de près de 60 % en acide gorlique. Mais il est impossible de pousser plus loin le fractionnement en raison notamment de la difficulté de produire au laboratoire une température inférieure à -18° .

Cristallisation fractionnée des acides gras
du "beurre de Gorli"

- Cristallisation des acides gras totaux

75 g dissous dans 750 ml d'acétone

N° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
1	solide	36	93,4
2	"	18	92,9
3	"	6,5	75,5
4	liquide	14,5	125,7

- Cristallisation des acides gras liquides

10 g dissous dans 20 ml d'acétone

N° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
A	solide	3,8	100,9
B	liquide	6,2	141,3

b) des résultats figurant à ce tableau, l'on serait tenté d'induire une méthode de dosage de l'acide gorlique. En admettant d'une part, que la totalité de l'acide gorlique contenue dans le mélange primitif se concentre dans les acides liquides, et d'autre part, que ces acides liquides sont constitués uniquement par un mélange ne contenant que les acides gorlique et chaulmoogrique, il serait en effet très simple de déterminer la teneur du mélange en cet acide gras. Pour cela, il suffirait de calculer d'abord, à partir de l'indice d'iode connu, la teneur des acides liquides en acide gorlique ; puis, connaissant la proportion d'acide liquide obtenu à partir du mélange initial, on en déduirait le taux d'acide gorlique de ce mélange. Ce raisonnement, malheureusement est inexact, car il repose sur deux hypothèses entachées d'erreur :

- si les acides liquides retiennent en effet une fraction importante de l'acide gorlique contenu dans le mélange primitif, les acides gras solides entraînent aussi, en précipitant, des quantités non négligeables d'acides liquides. Ceci est facile à mettre en évidence puisque l'on constate que l'indice d'iode des fractions 1, 2 et A dépasse l'indice d'iode théorique des acides chaulmoogrique ou oléique : elles contiennent donc une certaine quantité d'acide diéthylénique ; d'ailleurs, il suffit de recristalliser dans l'acétone le mélange des fractions 1 et 2 pour obtenir un résidu possédant un indice d'iode de 101, ce qui démontre bien la présence d'acide gorlique dans les acides précipités.

- le calcul envisagé pour le dosage de l'acide gorlique est fondé sur l'hypothèse que le mélange des acides liquides est binaire et ne contient que les acides chaulmoogrique et gorlique. Or ceci est très peu probable. Le tableau n° 30 montre en effet que l'acide palmitique, comme nous le verrons d'ailleurs ci-dessous, précipite après l'acide chaulmoogrique et se concentre dans la fraction n° 3. Aussi est-il logique de penser que, puisque la solubilité de cet acide dans l'acétone est intermédiaire entre celle de l'acide chaulmoogrique et celle de l'acide gorlique, des quantités non négligeables de cet acide linéaire saturé subsistent dans les acides liquides. Le calcul de leur taux en acide gorlique se trouve alors faussé, et l'on fait une erreur par défaut.

Pour ces deux raisons, la quantité d'acide gorlique finalement trouvée est trop faible : elle s'élèverait pour le beurre de Gorli présentement étudié, et en

appliquant le calcul ci-dessus, à 7,2 % alors que les différents auteurs qui ont analysé les huiles de cette espèce indiquent des chiffres variant entre 10 et 15%.

Néanmoins, cette méthode de détermination ne nous semble pas totalement dépourvue d'intérêt pratique. Elle permettra d'indiquer un "taux minimum" en acide gorlique des lipides étudiés, que l'on peut déterminer pour les huiles de chaque espèce en soumettant à la cristallisation fractionnée, dans des conditions rigoureusement analogues, le mélange d'acides gras qu'elles contiennent. On pourra ensuite très facilement comparer la teneur en acide gorlique des lipides de divers échantillons de graines. D'autre part, par un raisonnement identique à celui qui vient d'être indiqué, on peut déterminer à partir de la fraction 3 le taux minimum en acide palmitique du mélange.

c) il n'est pas surprenant de constater, comme nous venons de le faire, que l'acide palmitique ne précipite qu'après l'acide chaulmoogrique. Ce phénomène, en effet, est parfaitement en accord avec les travaux de D. JOUATTE [58] qui extrait l'acide palmitique des solutions mères provenant des cristallisations de l'acide chaulmoogrique. Nous avons d'ailleurs également montré précédemment que les glycérides riches en acide palmitique précipitaient en dernier lieu au sein des solutions alcooliques, (indice d'iode faible des cristaux de première récolte).

Ces observations peuvent paraître en désaccord avec les résultats obtenus lors de la cristallisation fractionnée des glycérides, étudiée au précédent chapitre : nous avons observé alors que les fractions précipitant en premier lieu, possèdent l'indice d'iode le plus faible et sont par conséquent les plus riches en acide palmitique.

En fait, il n'y a nullement contradiction entre ces résultats, car les cristallisations dont nous venons de parler ont été effectuées au sein de l'éther de pétrole, alors que la cristallisation spontanée des glycérides, observée lors de notre étude de la méthode d'extraction, s'est effectuée au sein de l'éthanol. Or les solubilités des acides gras et des glycérides ne sont pas identiques dans l'éther de pétrole et dans les solvants oxygénés.

2 - GENERALISATION DE LA METHODE ET DISCUSSION -

A titre comparatif, le mélange d'acides gras des deux autres espèces dont les glycérides ont été précédemment étudiés, a été également soumis à une cristallisation fractionnée dans l'acétone. Mais alors que, pour le mélange des acides gras de Caloncoba glauca du Cameroun, on effectuait de nombreuses récoltes de cristaux, nous nous sommes contenté de deux récoltes seulement dans le cas des acides gras de Caloncoba Welwitschii du Gabon. Les résultats obtenus figurent au tableau n° 31.

Les huiles de Caloncoba glauca révèlent ici une forte teneur en acide gorlique puisque le taux minimum déterminé par la méthode indiquée ci-dessus atteint 13 % (alors qu'il ne dépassait pas 7,2 % dans le cas des acides gras du beurre de Gorli). Par comparaison aux résultats obtenus avec cette dernière espèce, ceci doit porter le taux réel en acide gorlique aux alentours de 20 %, taux très élevé et qui vient confirmer les résultats déjà obtenus lors de la cristallisation des glycérides (laquelle permettait d'obtenir 60 % environ de glycérides liquides), ainsi que les conclusions tirées à propos des échantillons de cette espèce à la fin de la première partie de ce travail. A l'inverse, le taux en acide palmitique est très peu élevé et ne doit guère dépasser 1 à 2 % (fractions n° 7 et 8).

Les résultats obtenus avec les acides gras de Caloncoba Welwitschii du Gabon sont à l'inverse beaucoup moins favorables, révèlent une teneur peu élevée en acide gorlique, et au contraire, une assez lourde surcharge en acide palmitique inactif. De plus, la taille minuscule de ces graines constitue aussi un élément défavorable, qui contribue à déprécier les huiles de cette origine.

Tableau n° 31

Cristallisation fractionnée des acides gras de Caloncoba glauca
du Cameroun
(75 g dans 750 ml d'acétone)

N° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
1	solide	8	98,7
2	"	7,5	100,8
3	"	5,5	98,4
4	"	6,5	101,2
5	"	6,5	96,5
6	"	6,5	91,1
7	"	5,5	88,9
8	"	7,5	86,5
9	liquide	23	130,1

Cristallisation fractionnée des acides gras de Caloncoba
Welwitschii du Gabon
(75 g dans 750 ml d'acétone)

N° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
1	solide	37	81
2	solide	13	76,8
3	semi-fluide	21	115,9

Mais si la cristallisation fractionnée des acides gras dans l'acétone permet de tirer quelques indications intéressantes concernant la constitution chimique des glycérides, elle n'a pas permis d'obtenir, en une seule série de cristallisations des fractions dont l'indice d'iode dépasse 133, c'est-à-dire contenant plus de 45 % d'acide gorlique. Même en procédant à une seconde cristallisation, on dépasse à peine un indice d'iode de 140, mais déjà la méthode se complique, les opérations se multiplient et l'on s'éloigne des objectifs proposés au début de cette étude, pour obtenir finalement des résultats encore très insuffisants. En effet, le mélange possédant un indice d'iode de 141,3 ne cristallise plus à la température minima obtenue grâce au réfrigérateur : -18°C ; il est donc nécessaire de pousser plus avant nos efforts, en faisant appel à des méthodes plus récentes.

C - FRACTIONNEMENT DES COMPLEXES "ACIDES GRAS-UREE"

1 - HISTORIQUE ET PRINCIPE DE LA METHODE -

Depuis la découverte fortuite par F. BENGEN [13] de la propriété que possèdent de nombreuses substances organiques de donner avec l'urée des composés d'addition stables, la séparation des acides gras par cristallisation fractionnée des complexes qu'ils sont susceptibles de donner avec l'urée est entrée dans la chimie des lipides. L'urée est en effet capable de former des complexes avec tous les composés possédant dans leur molécule une longue chaîne aliphatique. L'étude aux rayons X des composés obtenus révèle une structure très particulière, les molécules d'urée se disposant autour des chaînes aliphatiques selon une structure très caractéristique, formant une sorte de gaine rigide et dont la maille est hexagonale ; on comprend dès lors que seuls les corps à chaînes linéaires sont capables de former facilement de tels complexes, alors qu'au contraire, les composés ramifiés ou cycliques n'en donnent pas ou n'en donnent que difficilement. La stabilité du complexe obtenu est d'autant plus grande que la chaîne carbonée aliphatique est plus longue, les composés possédant des chaînes

à moins de 6 atomes de carbone n'étant généralement plus capables de donner avec l'urée de tels complexes d'addition.

La préparation de ces complexes est fort simple : on met en contact une solution alcoolique du corps à complexer avec l'urée. Le complexe d'addition se forme aussitôt et précipite : on le recueille par filtration et il suffit de le porter dans de l'eau bouillante pour le détruire. La substance organique insoluble dans l'eau est ainsi régénérée et il est facile de l'extraire par un solvant approprié.

Cette technique a été largement utilisée depuis lors, dans la chimie des corps gras. M. MORENO et V. RONCERO ont pu ainsi séparer les acides gras des esters [79] ou des glycérides [78]. La méthode a également permis de séparer les acides gras saturés des acides non saturés, les premiers ayant une chaîne linéaire, alors que les seconds (tout au moins sous la forme cis-trans qui est leur forme naturelle) ont des chaînes "anguleuses". Il en résulte que les acides gras saturés donnent plus facilement des complexes qui précipitent alors que les acides à chaîne mono ou polyéthylénique restent en solution. Ceci a pu être mis en évidence par les travaux de H. SCHLENK et R.T. HOLLMAN [114] ainsi que par H. A. NEWEY [83] qui ont pu séparer ainsi les acides gras de diverses huiles siccatives.

Cependant la séparation des acides gras de l'huile de Chaulmoogra par cette méthode n'avait encore jamais été tentée. Le procédé pourtant est séduisant, et il y a tout lieu de penser que, en fonction de ce qui vient d'être dit, il doit permettre de séparer ainsi successivement l'acide palmitique, puis les acides chaulmoogrique et oléique, cependant que l'acide gorlique reste en solution. L'acide palmitique, en effet, se combine très facilement avec l'urée étant exclusivement constitué par une longue chaîne linéaire saturée. L'acide oléique se combine plus difficilement en raison de sa liaison éthylénique ; l'acide chaulmoogrique doit pouvoir donner des complexes dans les mêmes conditions, car il possède dans sa molécule une chaîne saturée de 13 atomes de carbone, mais le cycle penténique contrariera vraisemblablement cette propriété. Quant à l'acide gorlique, il est à la fois cyclique et éthylénique et il est logique de penser qu'il ne se combinera pas, ou tout au moins très difficilement, à l'urée.

2 - FRACTIONNEMENT DES ACIDES GRAS DE L'HUILE DE CALONCOBA WELWITSCHII -

Première technique opératoire utilisée

Les acides gras provenant de Caloncoba Welwitschii du Gabon (espèce la plus pauvre en acide gorlique) ont servi à la première expérience : 5 g d'acides gras sont dissous dans 100 ml d'une solution saturée d'urée dans le méthanol (solution contenant environ 16 g d'urée). On observe aussitôt à la température du laboratoire une abondante cristallisation. Les cristaux sont essorés sur un filtre de Büchner, lavés au moyen d'une solution saturée d'urée dans le méthanol, puis placés dans une fiole d'erlenmeyer et additionnés d'acide chlorhydrique très dilué ; le mélange est porté à l'ébullition, le complexe est décomposé aussitôt, l'urée reste en solution sous forme de chlorhydrate soluble, cependant que les acides gras sont libérés et viennent surnager. Après refroidissement de la solution, on extrait par l'éther de pétrole, puis la solution est décantée, séchée et finalement distillée dans les conditions habituelles pour éliminer le solvant. On détermine l'indice d'iode des acides gras ainsi régénérés.

Ces cristallisations sont poursuivies à plusieurs reprises à des températures de plus en plus basses et l'on sépare ainsi plusieurs fractions qui sont ensuite traitées comme précédemment pour régénérer les lipides. Lorsque les eaux-mères refusent de cristalliser, on concentre par distillation pour récupérer l'alcool méthylique et le résidu est également traité par l'acide chlorhydrique puis dilué par de l'eau et porté à ébullition. On sépare ainsi les acides gras qui ne sont pas combinés à l'urée. Les résultats obtenus figurent au tableau n° 32.

Tableau n° 32

Cristallisation fractionnée des complexes de l'urée et
des acides gras de Caloncoba Welwitschii du Gabon
(100 ml de méthanol, 16 g d'urée, 5 g d'acides gras)

Conditions opératoires	n° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
à 20°	1	solide	0,75	56,7
1 h à 0°	2	"	0,50	64
24 h à 0°	3	"	1,20	79,1
1 h à -10°	4	"	1,05	89,4
24 h à -10°	5	"	1,00	92,5
24 h à -18°	6	liquide	0,15	110,5
résidu	7	liquide	0,50	158,9

Etude des résultats

L'examen de ce tableau montre que les résultats obtenus répondent à notre attente. La presque totalité de l'acide gorlique du mélange initial s'est concentrée dans la dernière fraction qui n'a pas donné de complexe avec l'urée. Cette fraction avec un indice d'iode de 158,9, chiffre jamais atteint jusqu'ici, contient 75% d'acide gorlique. C'est-à-dire que l'on a extrait ainsi 0,375 g d'acide gorlique pour 5 g de mélange d'acides gras primitif, ou, en pourcentage, 7,5 g d'acide gorlique pour 100 g de mélange, soit en définitif une quantité supérieure à celle extraite par simple cristallisation des acides gras du beurre de Gorli pourtant beaucoup plus riches, nous l'avons vu. De plus, l'acide gorlique obtenu est beaucoup plus pur. Cette méthode présente donc sur la simple cristallisation fractionnée un double avantage :

- un rendement plus élevé : en effet la recristallisation fractionnée dans l'acétone du mélange des fractions 1 à 4 ne permet pas d'obtenir une fraction résiduelle d'indice d'iode supérieure à l'indice théorique de l'acide chaulmoogrique (valeur obtenue pour la dernière fraction : 89,8) : ces fractions sont donc totalement dépourvues d'acide gorlique, et l'on a pas à déplorer ici de pertes, même légères, du principe actif, comme cela était le cas lors de la simple cristallisation du mélange d'acide gras totaux. L'indice d'iode de la fraction n° 5 révèle qu'elle contient de légères traces d'acide gorlique. La quasi totalité se retrouve finalement dans les deux dernières fractions.

Il est donc possible maintenant de déterminer, non plus seulement le taux minimum mais bien le taux réel en acide gorlique par simple calcul. En effet, les deux hypothèses que nous avons formulées en indiquant précédemment le mode de calcul de la teneur du mélange en acide gorlique sont maintenant vérifiées : d'une part, la totalité de l'acide se retrouve dans les fractions dont l'indice d'iode dépasse l'indice théorique de l'acide chaulmoogrique (ici les deux dernières fractions pratiquement) d'où la possibilité de déterminer leur teneur; d'autre part, la constitution du mélange est binaire. En effet, tout l'acide palmitique est éliminé dans les premières fractions, cette fois, et non plus dans les dernières, comme précédemment.

- une plus grande pureté, puisque l'on obtient, en une seule opération, une fraction contenant 75 % d'acide gorlique.

Ces résultats très favorables nous ont encouragé à poursuivre dans cette voie et nous avons tenté d'améliorer la méthode afin de pouvoir obtenir une fraction encore plus riche en principe actif.

Deuxième technique opératoire utilisée

Une seconde expérience a donc été tentée avec le même mélange d'acides gras (dont le taux peu élevé en acide gorlique constitue une circonstance défavo-

nable et nous permet de considérer l'ensemble de ces résultats comme une limite inférieure de la valeur de la méthode), en effectuant les premières cristallisations sur une solution moins concentrée en urée puis en augmentant cette concentration à deux reprises, d'une part, au moment où la solution ne cristallise plus à -4°, d'autre part, lorsqu'elle n'abandonne plus de cristaux à -18°. Les additions successives d'urée entraînent chaque fois une nouvelle précipitation, ce qui devrait permettre d'obtenir une fraction résiduelle encore plus riche en acide gorlique. L'hypothèse est confirmée par l'examen des résultats figurant au tableau n° 33.

Tableau n° 33

Cristallisation fractionnée des complexes de l'urée et
des acides gras de Caloncoba Welwitschii du Gabon
 (200 ml de méthanol, 20 g d'urée, 20 g d'acides gras)

Conditions opératoires	n° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
20 g d'urée à 20°	1	solide	0,6	55,3
1 h à -4°	2	"	5	68
24 h à -4°	3	"	2,5	77,4
+ 20 g d'urée				
24 h à -4°	4	"	3,9	89
1 h à -18°	5	"	4,5	90,9
24 h à -18°	6	liquide	1,2	113,1
+ 20 g d'urée				
24 h à -18°	7	liquide	1	151,4
Résidu	8	liquide	0,7	167,4

Discussion des résultats

On aboutit à une fraction non cristallisable possédant un indice d'iode de 167,4 c'est-à-dire contenant 88 % d'acide gorlique. Malheureusement, cette fraction ne contient plus la totalité de l'acide gorlique contenu dans le mélange initial. Une quantité notable a en effet, été entraînée sous forme de complexe lors de la dernière addition d'urée comme le révèle l'indice d'iode très élevé de la fraction n° 7, soit 151,4. Néanmoins l'indice d'iode moyen des deux dernières fractions reste pratiquement identique à celui trouvé pour la dernière fraction de l'expérience précédente. On peut donc dire que l'addition d'un gros excès d'urée en fin d'opération permet de séparer une fraction possédant un indice d'iode voisin de 160 en deux fractions, dont l'une possède un indice de 167,4 et l'autre de 151,4 : on purifie, mais on perd de l'acide gorlique. Pour le reste, la cristallisation s'est déroulée dans les mêmes conditions qu'au cours de l'expérience précédente ; la première addition d'urée semble n'avoir entraîné aucune modification dans l'évolution du phénomène.

La totalité de l'acide gorlique du mélange se retrouve dans les trois dernières fractions où il est facile de le doser selon le mode de calcul déjà indiqué (1). Le résultat s'élève à 7,7 %.

 (1) 1/ - Valeur moyenne de l'indice d'iode des trois dernières fractions :

$$\frac{(113,1 \times 1,2) + (151,4 \times 1) + (167,4 \times 0,7)}{1,2 + 1 + 0,7} = \frac{404,3}{2,9} = 139,4$$

"T.S.V.P"

On retrouve donc, dans cette seconde série de cristallisations, une teneur en acide gorlique très voisine de celle calculée avec les valeurs obtenues lors de la première série, soit 7,5 % (en fait la teneur réelle est très légèrement supérieure à ces chiffres, car nous avons négligé dans les deux cas, les traces d'acide gorlique souillant les fractions n° 5).

Nous pouvons tirer de l'ensemble de ces résultats les conclusions suivantes :

a) la méthode permet un dosage rapide et précis de l'acide gorlique contenu dans un mélange d'acides gras de Caloncoba, selon le calcul indiqué ci-dessus. On peut aussi doser, suivant ce principe, l'acide palmitique.

b) selon le but que l'on se propose, on utilisera l'une ou l'autre technique. - On choisira la première technique si l'on désire extraire la totalité de l'acide gorlique ou encore si l'on veut doser cet acide dans le mélange. - On préférera par contre, utiliser la seconde technique si l'on désire obtenir un produit très pur au risque de perdre une quantité notable d'acide gorlique. Il suffira d'ajouter alors après la dernière récolte de cristaux, un nouvel excès d'urée, comme cela a été dit ci-dessus. On peut ainsi obtenir en un seul fractionnement un produit contenant près de 90 % d'acide gorlique.

3 - FRACTIONNEMENT DES ACIDES GRAS DE CALONCOBA ECHINATA -

Le mélange d'acides gras résultant de la saponification du "Beurre de Gorli" a été ensuite cristallisé en tenant compte des remarques que nous venons de faire. Les résultats obtenus figurent au tableau n° 34.

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus dans les séries précédentes. Connaissant l'indice d'iode des trois dernières fractions, il est facile de déterminer la teneur du mélange en acide gorlique, soit environ 11 %, par un calcul identique à celui que nous venons d'exposer.

Remarquons encore que les indices d'iode des fractions n° 4 et 5 correspondent à de l'acide chaulmoogrique presque pur. Il suffit de recristalliser le mélange de ces deux fractions pour obtenir cet acide chimiquement pur. Nouvelle application de la méthode.

Il eût été intéressant d'extraire également par cette méthode l'acide gorlique contenu dans les huiles extraites des graines de Caloncoba glauca du Cameroun. Malheureusement nous ne possédions plus un lot assez important de graines, pour pouvoir entreprendre cette opération.

Suite de la note de la page précédente.

2/ - Teneur en acide gorlique dans le mélange des trois dernières fractions déterminé en fonction des données suivantes :

- les 2,9 g possédant un indice d'iode de 139,4, contiennent tout l'acide gorlique du mélange initial.

- l'indice d'iode de l'acide chaulmoogrique pur est de 90,5.

- l'indice d'iode de l'acide gorlique pur est de 182,5.

- le mélange ne contient que ces deux acides, car tout l'acide palmitique a été éliminé lors des premières cristallisations (l'acide oléique ne fausse pas le calcul car il possède le même indice d'iode que l'acide chaulmoogrique) :

$$\frac{100 \times (139,4 - 90,5)}{(182,5 - 90,5)} = 53 \%$$

3/ - Teneur en acide gorlique du mélange initial :

$$\frac{53}{2,9} = 7,7 \%$$

Cristallisation fractionnée des complexes de l'urée
et des acides gras de Caloncoba echinata
 (200 ml de méthanol, 20 g d'urée, 20 g d'acides gras)

Conditions opératoires	n° des fractions	Etat Physique	Poids (g)	Indice d'iode
20 g d'urée à 20°	1	solide	1, 1	59
1 h à 0°	2	"	2	80
24 h à 0°	3	"	2, 5	86, 5
1 h à -10°	4	"	5, 5	89, 2
24 h à -10°	5	"	5	90, 5
24 h à -18°	6	liquide	1	112
+ 20 g d'urée				
24 h à -18°	7	liquide	1, 4	156
résidu	8	liquide	1, 1	170, 6

4 - CRITIQUE DE LA METHODE -

Nous sommes en possession d'une méthode de séparation de l'acide gorlique qui donne des résultats très satisfaisants, et qu'il ne doit guère être possible d'améliorer.

Il est bien évident que les fractions à haut indice d'iode que nous avons obtenues au cours de la cristallisation fractionnée des complexes ne sauraient être utilisées directement dans une expérimentation thérapeutique, car elles correspondent à des acides gras libres. Il restera donc à les transformer en une forme médicamenteuse directement utilisable, soit qu'on les neutralise par un alcalin, mais nous avons vu (page 72) que l'utilisation des savons présente un certain nombre d'inconvénients, soit qu'on les estérifie à nouveau par l'éthanol. On obtient alors très aisément des esters éthyliques contenant environ 80 % de gorlate d'éthyle. Ce produit pourra même subir une nouvelle rectification par distillation et mènera à l'ester chimiquement pur, selon la méthode de COLE et CARDOSO [30].

Les autres acides cyclopenténiques actifs, qui ont été séparés lors de la cristallisation des complexes seront également estérifiés puis utilisés selon le procédé classique de traitement. La méthode proposée n'entraîne donc aucune perte en médicament actif.

Elle présente cependant l'inconvénient de nécessiter le passage par les acides gras libres en d'autres termes d'exiger une extraction préalable de ceux-ci - après saponification des glycérides - puis une estérification de ces acides gras, en vue de préparer les esters éthyliques. Afin d'apporter une nouvelle simplification au procédé décrit en éliminant ces opérations supplémentaires, nous avons tenté le fractionnement des esters éthyliques eux-mêmes, préparés directement à partir des graines de Caloncoba echinata selon la méthode décrite au titre II de la 3ème partie de ce travail.

5 - APPLICATION DE LA METHODE AUX ESTERS ETHYLIQUES -

Les esters éthyliques sont en effet capables de fournir des complexes avec l'urée dans les mêmes conditions que les acides gras dont ils dérivent. Nous avons donc procédé à l'expérience suivante :

20 g d'esters éthyliques de Caloncoba echinata dissous dans 200 ml d'une solution de méthanol saturée d'urée, sont portés durant 24 heures à -18° et, après ce temps, l'on sépare la fraction restée liquide de la fraction précipitée.

Les esters sont alors régénérés par la méthode déjà indiquée pour les acides gras, et l'on détermine l'indice d'iode des deux fractions finalement obtenues, soit 82,4 pour les 17,5 g d'esters précipités sous forme de complexes et 127,5 pour les 2,5 g d'esters restés en solution. En tenant compte des valeurs des indices d'iode théoriques du gorlate d'éthyle (166) et du chaulmoograte d'éthyle (83), valeurs qui sont évidemment plus faibles que celles des acides gras correspondants, on peut déterminer la teneur en acide gorlique des esters liquides, soit 54 %. Cette séparation très rapide permet donc d'obtenir facilement une fraction contenant près de 55 % de gorlate d'éthyle, résultat qui nous paraît très satisfaisant en égard de la rapidité et de la simplicité avec lesquelles il a été atteint.

Par contre, en séparant ainsi les esters totaux en deux fractions seulement, on observe qu'une partie importante du gorlate d'éthyle a été entraînée avec les esters des autres acides gras pendant la cristallisation : en effet, les esters totaux de *Caloncoba echinata* contiennent, nous l'avons vu, 11 % de gorlate d'éthyle alors que le calcul du taux en gorlate d'éthyle du mélange initial, basé sur le poids et l'indice d'iode de la fraction liquide, indique seulement pour le mélange un taux de 7 % seulement : il en résulte que la fraction précipitée a entraîné environ un tiers du gorlate d'éthyle du mélange. Pour éviter cette perte, il faut effectuer plusieurs cristallisations successives, comme cela a été fait lors de la séparation des acides gras : l'opération est plus longue, mais les dernières fractions contiennent alors la totalité du gorlate d'éthyle du mélange initial a un degré de pureté supérieur à celui obtenu lors d'une séparation en deux fractions seulement.

Il n'en reste pas moins que la méthode est applicable aux esters éthyliques aussi bien qu'aux acides gras. Elle permet l'obtention rapide de fractions riches en gorlate d'éthyle. Si l'activité thérapeutique de ce produit devait répondre aux espérances qu'ont fondées sur lui plusieurs éminents léprologues, il serait facile de préparer ainsi très rapidement un médicament de tout premier choix.

Bien plus, en combinant la méthode de préparation des esters éthyliques qui a été étudiée au titre II de la 3ème partie, et cette méthode de séparation du gorlate d'éthyle que nous venons de développer, l'on obtient en deux opérations très simples, un résultat qui nécessiterait par les méthodes classiques les opérations suivantes : extraction des lipides, préparation des acides gras, cristallisation fractionnée, estérification, enfin rectification des esters par distillation. On apprécie ainsi l'avantage qu'il y aurait à employer successivement les deux méthodes que nous proposons en achevant ce travail.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Malgré les apports récents de la chimiothérapie et l'introduction des sulfones dans le traitement de la lèpre, les médicaments d'origine naturelle, tels que les huiles de chaulmoogra, continuent à être très largement utilisés. C'est ainsi, par exemple, que la consommation globale de l'Afrique en huiles de Chaulmoogra ne cesse de croître. Cependant les événements politiques de l'après-guerre ont rendu plus difficile l'importation des huiles originaires des Indes, de sorte que l'attention est de nouveau attirée par les différentes espèces de Flacourtiacées africaines, capables de fournir des huiles dont la constitution chimique est très voisine de celle des huiles de chaulmoogra asiatiques.

Dans la première partie de ce travail nous exposons rapidement les données fondamentales de la question, en rappelant que les huiles de chaulmoogra contiennent essentiellement des acides gras portant un noyau cyclopenténique, possédant un pouvoir rotatoire dextrogyre et auxquels la plupart des auteurs attribuent l'activité pharmacologique du médicament. Tous ces acides gras sont solides et possèdent en outre une liaison éthylénique à l'exception d'un seul, l'acide gorlique qui est liquide, diéthylénique, et semble manifester une activité thérapeutique toute particulière. Aussi donnera-t-on toujours la préférence à des huiles dont l'indice d'Iode élevé révèle une teneur importante en glycérides riches en acide gorlique et s'accompagne d'un point de fusion bas, ce qui facilite leur administration par voie parentérale.

Nous examinons dans la seconde partie de ce travail, des huiles originaires de plusieurs territoires africains de la Communauté et appartenant à des espèces botaniques différentes. Il résulte de cette étude que les caractères physiques (déviations polarimétriques, point de fusion) et la constitution chimique (teneur en acide chaulmoogrique et en acide gorlique notamment) des huiles obtenues varient, non seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi en fonction de divers facteurs, tels l'origine géographique, les conditions climatiques et hydrologiques de la région productrice etc. Cette observation est particulièrement évidente pour les espèces dont l'aire de dispersion géographique est très vaste et qui présentent un polymorphisme accentué dans leurs caractères botaniques, comme par exemple le Caloncoba Welwitschii et le Caloncoba glauca.

En ce qui concerne ces deux espèces, nous constatons que parmi les différents échantillons que le laboratoire a eu l'avantage de recevoir, ce sont les graines originaires du Cameroun qui contiennent les huiles dont la constitution chimique est la plus favorable. En effet ces lipides sont très pauvres en acide palmitique (dont on sait qu'il est dépourvu de toute activité antilépreuse), et sont presque exclusivement constitués par des glycérides d'acides cyclopenténiques actifs. Ils contiennent en particulier des taux élevés d'acide gorlique pouvant atteindre jusqu'à 20 % dans des échantillons de Caloncoba glauca. La constitution très favorable des huiles de cette espèce et de ce territoire devrait permettre d'envisager des essais de culture en vue du développement de la production de

ce médicament. Les graines originaires du Gabon fournissent, par contre, des huiles dont la composition est beaucoup moins favorable et dont la teneur en glycérides riches en acide palmitique, est toujours relativement élevée.

Les huiles de Camptostylus Mannii ne semblent pas devoir être retenues pour l'usage médical, car elles possèdent un point de fusion très élevé, lié à leur richesse en acide palmitique. Mais les graines de cette espèce se signalent par un fort rendement en huile dépassant 50 %. Aussi pourraient-elles être utilisées comme une source d'acides cyclopenténiques qu'il serait facile de séparer des autres acides gras par distillation des esters éthyliques.

Enfin les huiles de Caloncoba echinata dites "huiles de Gorli" originaires de la Côte d'Ivoire, sont riches en acides optiquement actifs. La culture de cette espèce ne modifie en rien la composition de l'huile et celle-ci ne varie pas non plus d'un échantillon à l'autre. Il est vrai que l'espèce est très peu polymorphe et que sa distribution géographique est relativement étroite. Pour toutes ces raisons les huiles de Gorli constituent un médicament très valable, dont l'usage paraît établi en Afrique Occidentale.

La préparation des huiles à partir de la matière première oléagineuse, s'effectue généralement par expression à chaud. En raison des conditions de préparation et de l'état de conservation des graines, les lipides obtenus sont, le plus souvent, acides et doivent être neutralisés avant leur emploi car les acides gras libres les rendent irritants, surtout lorsqu'ils sont destinés à être administrés en injections. De plus, les rendements sont médiocres et des pertes notables en glycérides actifs sont à déplorer.

Nous proposons, dans le titre I de la troisième partie de ce travail, une méthode d'extraction des lipides par l'éthanol bouillant. L'extraction s'effectue assez rapidement puisque les deux tiers des lipides contenus dans les graines oléagineuses sont pratiquement extraits en 6 heures et, de plus, le rendement est élevé. On obtient, au terme de l'extraction, un miscella trouble et coloré au sein duquel les glycérides précipitent au cours du refroidissement, cependant que les acides gras libres, une partie importante des matières insaponifiables et des phosphoaminolipides et la presque totalité des constituants non lipidiques de la matière première, solubilisés par l'éthanol bouillant, restent dissous. De sorte que les huiles ainsi préparées sont pratiquement neutres et peuvent être utilisées directement en injection. Elles sont aussi plus riches en acides cyclopenténiques, donc plus actives que les lipides totaux extraits par de l'éther de pétrole, puisqu'elles sont partiellement débarrassées des constituants non glycéridiques.

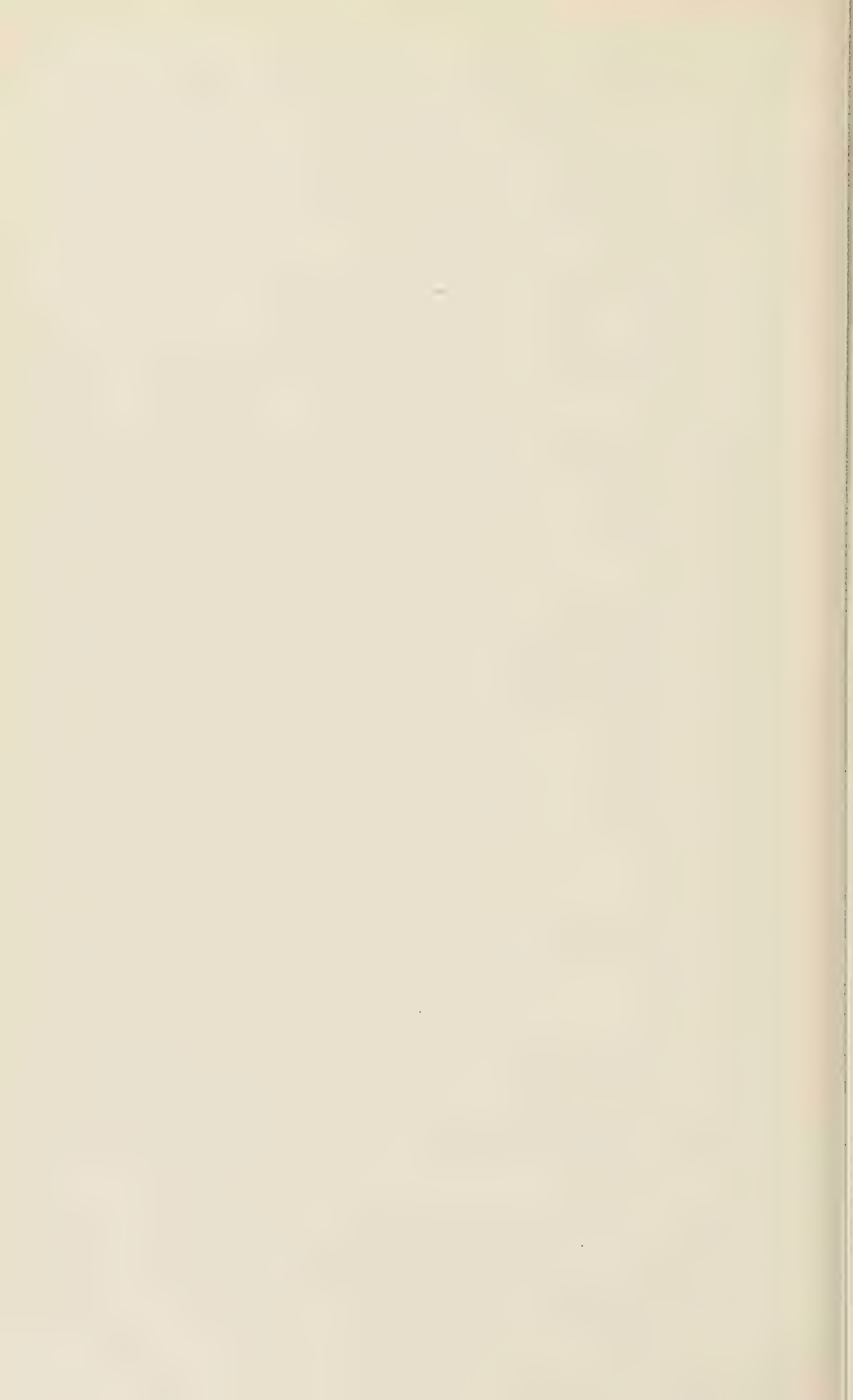
Mais l'utilisation directe des huiles de chaulmoogra se heurte à une difficulté majeure : leur point de fusion élevé rend leur administration difficile et douloureuse car elles se solidifient très rapidement au cours même de l'injection. C'est pourquoi on préfère utiliser les esters éthyliques correspondant aux acides gras totaux de l'huile et qui sont toujours fluides.

Ceci nous a conduit à préparer les esters éthyliques directement au cours de l'extraction par l'éthanol bouillant. Pour cela il suffit d'ajouter dans l'alcool destiné à l'extraction 2,5 à 3 % d'acide sulfurique pur. L'estérification se fait alors au fur et à mesure de l'extraction, et l'on obtient directement les esters en solution dans la phase alcoolique, qu'il suffit de traiter ensuite dans les conditions habituelles. La description de ce procédé qui évite le passage par l'intermédiaire des huiles proprement dites, fait l'objet du titre II de la troisième partie.

La quatrième partie de ce travail est consacrée à la recherche d'une méthode qui permette d'obtenir des produits possédant un indice d'iode élevé, ce qui correspond à une teneur importante en acide gorlique. En effet, l'extraction alcoolique n'a pas permis comme on pouvait l'espérer, la séparation sélective des glycérides riches en cet acide gras dont nous avons déjà signalé l'activité

thérapeutique marquée, mais qui n'a jamais pu être utilisé en raison de la difficulté à laquelle on se heurte pour l'extraire des huiles. Nous avons donc été amenés à entreprendre l'exploration systématique des méthodes utilisées pour le fractionnement des acides gras. La rectification sous pression réduite des esters éthyliques totaux, comme l'on s'y attendait, s'est révélée infructueuse. La cristallisation fractionnée des glycérides naturels ne conduit pas non plus à une séparation satisfaisante et le calcul statistique a confirmé les résultats qui avaient déjà été obtenus par différents auteurs : en effet, cette méthode ne permet pas d'obtenir des fractions contenant plus de 30 % d'acide gorlique. Des essais de préparation de trigorlide par transestérification dirigée se sont également soldés par un échec. C'est donc finalement sur les acides gras eux-mêmes qu'ont été poursuivis les essais de fractionnement. La simple cristallisation fractionnée permet déjà d'obtenir des résultats encourageants, mais laborieux. C'est en définitive la séparation des complexes acides gras-urée qui nous a conduit aux meilleurs résultats. Il est possible, par cette méthode, de préparer très rapidement des fractions contenant 80 à 90 % d'acide gorlique. Pour cela il suffit de procéder à une seule série de cristallisation fractionnée des complexes. La méthode permet également un dosage rapide de l'acide gorlique dans les huiles. Enfin elle est générale et peut être aisément appliquée aux esters éthyliques. Aussi, en combinant la méthode de préparation des esters éthyliques décrite ci-dessus, à ce procédé de fractionnement, il est facile d'obtenir immédiatement un produit très riche en gorlate d'éthyle, donc très actif.

Nous sommes obligé d'interrompre notre étude en espérant que les conditions nous permettront, dans un délai aussi proche que possible, de retirer des graines de Flacourtiacées, du gorlate d'éthyle en quantité suffisante pour que puisse être entreprise une étude clinique du produit. Pour cela il suffira d'appliquer le procédé que nous venons de décrire à de grandes quantités de matières premières, que nous espérons pouvoir obtenir rapidement. Quoiqu'il en soit, il s'agira surtout d'entreprendre une expérimentation clinique méthodique du produit afin de tenter de résoudre le problème, si longuement débattu, de son activité antilépreuse. La parole appartient donc maintenant au clinicien.



BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADRIAENS (L.) - Contribution à l'étude des plantes à huiles du Congo Belge : Caloncoba Welwitschii. Bull. Inst. Roy. Col. Belge 1932, 3, 374-395.
- [2] ADRIAENS (L.) - Recherche sur la composition chimique des Flacourtiacées à huile chaulmoogrique du Congo Belge. Bull. Inst. Roy. Col. Belge 1946, 15, 1-87.
- [3] ANDRE (E.) - Contribution à l'étude des huiles du groupe chaulmoogrique. C.R. Ac. Sc. 1925, 181, 1089-1091.
- [4] ANDRE (E.) et MAILLE (F.) - Contribution à l'étude des substances insaponifiables des crucifères. C.R. Ac. Sc. 1953, 237, 1763-1765.
- [5] ALEXIS (M.) et MENAUT (B.) - Recherches sur le traitement de la lèpre par le Krabao (Hydnocarpus anthelmintica Pierre). Ann. Med. et Pharm. col. 1925, 23, 201-237.
- [6] ARGOUD (S.) - L'insaponifiable de l'huile de palme. Oléagineux 1954, 9, 789-795.
- [7] BAUDON (A.) - Contribution à l'étude du genre Caloncoba en Afrique Equatoriale Française (document inédit transmis à Mr E. Perrot en novembre 1930).
- [8] BEAUDIMENT (R.) et RIVOALEN (P.) - Neutralisation des huiles de chaulmoogra. Ann. Med. et Pharm. Col. 1939, 37, 750.
- [9] BECKEL (A.C.) - Alcoholic extraction - J. Am. oil. chem. Soc. 1949, 26, 132.
- [10] BECKEL (A.C.) - The non distillation alcohol extraction process for Soybean oil. J. Am. Oil. Chem. Soc. 1948, 25, 10-11.
- [11] BECKEL (A.C.) BELTER (B.A.) et SMITH (A.K.) - Solvents effects of the products of soybean oil extraction. J. Am. oil. chem. Soc. 1948, 25, 7-9.
- [12] BEDDOME (R.H.) - Foresters Manual of Botany for Southern India 1873, 239, n° 8, 29.
- [13] BENGEL (F.) et SCHLENK (W.) - Uber neuartige additions verbindungen des Harnstoffs. Experimenta Basel 1949, 5, 200.
- [14] BIBLE - Lévitique - Chapitre 13, versets 45-46.
- [15] BIBLE - Luc - Chap. 17, versets 11-19 et Luc - Ch. 5, versets 12-14.
- [16] BLOCK (A.) et BOUVELOT (N.) - Emploi de l'huile de chaulmoogra et de ses dérivés dans le traitement de la lèpre - Ann. Med. et Pharm. Col. 1921, 19, 181-188.

- [17] BOUILLAT (M.) et TALEC (D.) - L'huile d'Hydnocarpus Wightiana et son administration par voie buccale. Rev. Med et Hyg. Trop. Paris Nov. Déc. 1933.
- [18] BREVET FRANCAIS n° 677-247 - 24 Juin 1924 - Paris, Société : Minami Manshu Tetsudo Kabushiki Kraïsha (Chine).
- [19] Bull. Imp. Inst. London. Gorli seed from Sierra Leone. 1913, 11, 439-441.
- [20] Bull. Imp. Inst. London. The Médicinal value of Oncoba oils. 1923, 21, 585-587.
- [21] BURSCHKIES (K.) Uber einige Carbonsäureester des chaulmoogryl und hydnocarpylalkohols - Ber 1938, 71, 233 et 1855. Ber 1939, 72, 1012.
- [22] BUU HOI (NP) GAGNANT (P.) JANICAUT (J.) - Contribution à la chimie des médicaments antilépreux. C. R. Ac. Sc. 1941, 212, 577-579.
- [23] BUU HOI (NP) LE BIHAN (H.) RAYET (P.) BRUCKNER (P.) - Contribution à la pharmacologie des dérivés de l'huile de chaulmoogra. Arch. int. Pharmacod. Ther. Belge 1951, 87, 179.
- [24] BUU HOI (NP) et RATSIMANANGA (J.) - Contribution à l'étude de la toxicité du chaulmoogra et de ses dérivés - Bull. Soc. chim. biol. 1941, 23, 459.
- [25] CARLES (J.) - Microdosage colorimétrique du phosphore - Bull. Soc. chim. biol. 1956, 38, 255-257.
- [26] CHAUSSINAND (R.) - La lèpre 1 vol. - L'expansion scientifique Française 1950.
- [27] CHEVALIER (A.) - Exploration botanique de l'A. O. F. 1 vol. Paris. Lechevalier 1920.
- [28] COLE (H. I.) et CARDOSO (H. T.) - Alepric, aleprylic, aleprestic and aleprolic acids, new homologs of chaulmoogric acid. J. Amer. Chem. Soc. 1939, 61, 2349-2351.
- [29] COLE (H. I.) et CARDOSO (H. T.) - Analysis of chaulmoogra oil. II. Oncoba echinata (Gorli) oil. J. Amer. Chem. Soc. 1938, 60 ; 617-619.
- [30] COLE (H. I.) et CARDOSO (H. T.) - Isolation and properties of Gorli acid an Optically Active Liquid Fatty Acid. J. Amer. Chem. Soc. 1938, 60, 612-614.
- [31] COLE (H. I.) et CARDOSO (H. T.) - Hydnocarpic and Chaulmoogric acids and ethyls esters. J. Amer. Chem. Soc. 1937, 59, 663.
- [32] COTTET (J.) - La lèpre et son traitement - La semaine médicale 22ème année 10 Juin 1952.
- [33] Courrier de l'UNESCO - Le nouveau visage de la lèpre. Mai 1958, 18-22.
- [34] CUVIER (P.) - Généralités sur les carotènes - Institut de Recherche pour les huiles et oléagineux 1955 - Série Scientifique n° 8, 2-7.
- [35] DEAN (A. L.) et WRENSHALL (R.) - Fractionation of chaulmoogra oil J. Amer. Chem. Soc. 1920, 42, 2626.
- [36] DELSAL (J.) et MACHEBOEUF (M.) - Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans les matières organiques - Bull. Soc. chim. biol. 1943, 25, 116-120.
- [37] DESPREZ (G.) - Etude sur le chaulmoogra - Thèse Pharm. Paris 1900.
- [38] ECKEY (E. W.) Directed Interestérification in glycerides. Ind. Eng. Chem. 1948, 40, 1183-1190.
- [39] EDDY (C. F.) Brevet U. S. A. P n° 1607-731 - 23 novembre 1927.

- [40] FRANCOIS (M. Th.) - Examens des graines de Gorli cultivé - Bull. Sc. pharmac. 1929, 35, 339-342.
- [41] FRANCOIS (M. Th.) - Rapport de mission en A. O. F. - Médecine Tropicale 1955, 15, 696-721.
- [42] GATE (J.) et ROUSSET (J.) - Les traitements actuels de la lèpre. J. de med. de Lyon 5 septembre 1949, 661-667.
- [43] GELARIE (A. J.) et GREENBAUM (F. R.) L'huile de chaulmoogra et sa saponification. Bull. Sc. pharmacol. 1927, 34, 527.
- [44] GEORGI (C. D. V.) BUCKLEY (T. A.) et GUNN LAY TEIK - Hydnocarpus oils in Malaya. Departement of Agriculture. Scientific Series. Kuala-Lumpur 1932, 9, 1-18.
- [45] GILG (E.) - Flacourtiacées, in ENGLER (A.) et PRANTL (K.) - Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig 1925, 21, n° 2, 398.
- [46] GILG (E.) - Flacourtiaceae Africanae. Bot. Jahrbüch 1908, 40, 453-464.
- [47] GIL-QUINZA (S.) et RIBOSA ARNO (P.) - Contribution à l'étude de l'huile de chaulmoogra et de quelques-uns de ses dérivés oléagineux 1956, 10, 619-625.
- [48] GLOYER (S. W.) - Furans in Vegetable oil Refining. Ind. Eng. chem. 1948, 40, 228-236.
- [49] GONZALEZ GOMEZ (C.) et PEREIRA (A.) - Contribucion al estudio de la "Caloncoba Mannii" de la Guinea Espanola. An. del Inst. Jose Celestino Mutis Madrid 1946, 5, 17.
- [50] GORDON (E.) - Fractionnement d'une huile par extraction au moyen de solvants sélectifs. ITERG Bull. mensuel d'information 1947, 3, 23-25.
- [51] GOULDING (E.) et ACKERS (N. C.) - Note on the fat of the seeds of *Oncoba echinata* : occurrence of chaulmoogric acid. Proc. chem. Soc. 1913, 29, 197-198.
- [52] GUILLERM (J.) BANOS (A.) et NGUYEN VAN LIEN - L'utilisation du Krabao Indochinois pour le traitement de la lèpre - Arch. Inst. Pasteur d'Indochine 1933, 18, 171-185.
- [53] HALLER (A.) - C. R. Ac. Sc. 1906, 143, 657 - in François (41).
- [54] HASSELTINE - The treatment of Leprosy with derivatives of chaulmoogra. oil. US Publ. Health. Bull. 1924, 141, 35.
- [55] HEINRICH (S.) - Répartition du phosphore dans les différentes phases de l'extraction alcoolique des graines oléagineuses. Bull. Soc. Pharm. Nancy 1959, 41, 5-9.
- [56] HUTCHINSON (J.) et DALZIEL (J. M.) - Flora of West Tropical Africa vol. 1. Tome 1 - London 2ème édition 1954, p. 185.
- [57] JARDIN (C.) - Rapport d'activité du service de préparation de médicaments antilépreux de l'Institut Marchoux - Année 1953 in François (41).
- [58] JOUATTE (D.) - L'huile de Gorli (*Oncoba echinata*, Oliver) Succédané de l'huile de chaulmoogra - Thèse Pharm. Paris 1927.
- [59] JUMELLE (R. L.) - Les huiles de chaulmoogra, leurs origines, leurs caractères et leur mode d'action. Thèse méd. Paris 1926.
- [60] KAUFFMAN (H. P.) - Analyse der Fette und Fettprodukte 1958, 2 tomes Springer-Verlag Berlin/Göttingen/Heidelberg.
- [61] KAUFFMAN (H. P.) et DESHPANDE (M.) - Fette, Seifen, Anstrichmittel 1958, 60, in Kauffman (60).

- [62] KENYON (R. L.) GLOYER (S. W.) et GEORGIAN (C. C.) - Sélective extraction of vegetables oils with furfural. Ind. Eng. Chem. 1948, 40 1162.
- [63] KHANGY (A. K.) - Contribution à l'étude de l'extraction de l'huile de lin par les solvants organiques notamment par l'alcool, Thèse Sc. Paris 1954.
- [64] KIRTIKAR et BASU - Indian Medicinal Plants. Allahabad 1918, 1, 124 in Perrot (94).
- [65] KUHN (R.) et BROCKMANN (H.) Carotin (Uber das Vitamin des Wachstums (IV Mitteil) Ber 1933, 66, 407.
- [66] KUHN (R.) et LEDERER (E.) - Zerlegung des Carotins in seine Komponenten (Uber das Vitamin des Wachstums I Mitteil) Ber 1931, 64, 1349.
- [67] LABERNADIE (V.) et ANDRE (E.) - Essai de traitement de la lèpre par des injections intraveineuses d'huile de chaulmoogra pure. Bull. Soc. Path. exot. 1933, 26, 988.
- [68] LABERNADIE (V.) et LAFFITTE (N.) - Traitement de la lèpre par l'Hydnocarpus Wightiana. Bull. Soc. path. exot. 1927, 20, 8.
- [69] MATHIVAT (R.) - Le Chaulmoogra du Cameroun. Thèse Pharm. Paris 1929.
- [70] MAYOLLE (M. J.) - Introduction à l'étude de l'extraction des graines par l'alcool. ITERG. Bull. mensuel d'information 1950, 9-10, 453-455.
- [71] MAYOLLE (M. J.) - Recherches sur l'extraction par solvants. ITERG Bull. mensuel d'information 1952, 2, 96-101.
- [72] Méthodes unifiées Internationales 5 A - Union Internationale de Chimie, 28, rue St-Dominique, Paris (Norme Française NF, T 60-204).
- [73] Méthodes unifiées Internationales 6 A (Norme américaine AOCS Ca 6 a 40).
- [74] Méthodes unifiées Internationales 6 B (Norme américaine AOCS Ca 6 b 40).
- [75] Méthodes unifiées Internationales 11 A (Norme Française NF, T 60-203).
- [76] Méthodes unifiées Internationales 13 a.
- [77] MICHEL (R.) - Traitement de la lèpre par l'association sulfone chaulmoogra - Thèse Méd. Bordeaux 1949.
- [78] MARTINEZ MORENO (J. M.) et VASQUEZ RONCERO (A.) - Application des composés cristallins de l'urée avec des substances organiques à la chimie des graisses : séparation des mélanges de triglycérides et d'acides gras. Oléagineux 1951, 7, 436.
- [79] MARTINEZ MORENO (J. M.) et VASQUEZ RONCERO (A.) - Séparation des acides gras et de leurs esters sur colonne d'urée. Ann. Réal. Soc. Esp. Fis. Quin. 1953, 49 b, 539.
- [80] MUIR (E.) - Comments on the present position of the treatment of Leprosy. Indian Medical gazette 1927, 62, 211-219.
- [81] MUIR (E.) - Manual of Leprosy (Livingstone Ltd. Edinburgh 1948).
- [82] MUIR (E.) - The preparation of Hydnocarpus esters and their use in Leprosy. Indian J. Med. Research 1924, 12, 221-223.
- [83] NEWAY (H. A.) SHOKAL (E. C.) MUELLER (A. C.) BRADLEY (I. F.) FETTERLY (L. C.) - Drying oils and Resins. Segregation of fatty acids and their derivatives by extractive crystallization with urea. Ind. Eng. Chem. 1950, 42, 2538-2541.
- [84] Normes américaines A. O. S. C. Cc, 1, 25.
- [85] Normes américaines A. O. S. C. Cd, 6, 38.
- [86] Oliver (D) Flora of Tropical Africa, London 1868, Tome 1, 118.

- [87] PAGET (H.) - The liquids acids of Sapucainha oil - J. chem. Soc. 1937, 1, 955-960.
- [88] PASCALET (R.) - Le Caloncoba glauca. Togo-Cameroun Magazine Paris, février 1929, p. 65.
- [89] PEIRIER (J.C.) - Contribution à l'étude des plantes oléagineuses du Cameroun - Thèse Sc.Marseille 1930.
- [90] PEIRIER (J. C.) - Les Caloncoba à huile antilépreuse du Cameroun C. R. Ac. Sc. 1929, 189, 471.
- [91] PEIRIER (J.C.) - L'huile de Caloncoba glauca - Bull. de l'agence économique du Cameroun. Paris déc. 1927, n° 14.
- [92] PEIRIER (J. C.) - Soluté de chaulmoograte de sodium pour injections intra-veineuses. Bull. Soc. Path. exot. 1931, 24, 772-778.
- [93] PERKINS (G. A.) et CRUZ (A. O.) - A comparative analytical Study of various oils in the chaulmoogra group. Philip. J. of Sc. Manille 1923, 23, 543-573.
- [94] PERROT (E.) - Chaulmoogra et autres graines utilisables contre la lèpre. Notice n° 24, avril 1926. Travaux de l'Office National des matières premières végétales, publiés par le Ministère du Commerce et de l'Industrie.
- [95] PERROT (E.) - Huile de Caloncoba glauca - Bull. Sc. Pharmacol. 1928, 35, 260-263.
- [96] PERROT (E.) - Les espèces chaulmoogriques et en particulier le Krabao Indochinois pour le traitement de la lèpre. Bull. Sc. Pharmacol. 1934, 41, 641.
- [97] PERROT (E.) et FRANCOIS (M. Th.) - Vœu concernant des caractères à exiger d'huiles dites de chaulmoogra pour une entente Internationale. XIIème Congrès International de Pharmacie. Bruxelles.
- [98] PLUCHON (J.P.) - Note sur un procédé de désacidification de l'huile de chaulmoogra injectable. Ann. Med. et Pharm. Col. 1939, 37, 220-224.
- [99] PORTER (J.W.) et LINCOLN (R. E.) - Selection containing a high content of carotènes and colorless polyènes. II. The mechanism of carotène biosynthesis. Arch. Biochem. 1950, 27, 390-403.
- [100] POWER (F. B.) et BARROWCLIFF (M.) - The constituents of the seeds of Hydnocarpus Wightiana and of Hydnocarpus anthelminthica. Isolation of an homologue of chaulmoogric acid. J. Chem. Soc. Transactions 1905, 87, 864-896.
- [101] POWER (F. B.) et GORNAL (F. H.) - The constituents of chaulmoogra seeds. J. Chem. Soc. Transactions 1904, 85, 838-851.
- [102] POWER (F. B.) et GORNAL (F. H.) - The constitution of chaulmoogric acid. J. Chem. Soc. Transactions 1904, 85, 851-861.
- [103] PRAIN (D.) in DESPREZ n° 37.
- [104] QUEREC (Le) - L'insaponifiable de l'huile de chaulmoogra. Bull. Soc. path. exot. 1937, 30, 889.
- [105] RAINERO (J. M.) - Les esters d'acides gras d'Oncoba echinata, employés dans le traitement de la lèpre (huile de chaulmoogra) Oléagineux 1954, n° 3, 173-175.
- [106] Rapport de l'Institut National d'études agronomiques du Congo Belge (INEAC) Recherche sur les Flacourtiacées indigènes 1939.
- [107] Rapport du 4ème Congrès des Matières premières coloniales 1936, p. 227 (in Adriaens 2).

- [108] REGENT (M.) et FRANCOIS (M.Th.) - Détermination du point de fusion des graisses alimentaires. J. Rech. CNRS 1949, 8, 227.
- [109] ROCK (F. J.) - The chaulmoogra tree and some related species. A survey conducted in Siam, Burna, Assam and Bengal. Bull. of. U.S. Départ. Of agriculture. Washington 1922, 1057.
- [110] ROGERS (L.) - Combined chaulmoograte and sulfone treatment of Lerposy and tuberculosis. Laucet 1948, 254, 515.
- [111] ROGERS (L.) Ind. J. Med. Research 1919, (in Peirier 92).
- [112] ROGERS (L.) et MUIR (E.) Leprosy. J. Wright Bristol 1946.
- [113] SANTOS RUIZ (A.) et SANTOS MERINO (A.) Chemical Composition of the seeds of Caloncoba Welwitschii. Ann. Soc. Esp. Fis. Quim. 1944, 40, 951-974.
- [114] SCHLENK (W.) et HOLLMAN (R.T.) - Séparation and stabilization of fatty acids by urea complexes. J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 5001-5004.
- [115] SCHWARTZ (A.K.) - Solvent extraction of the Soybean. Oil and. Fat. ind. 1927, 4, 284-288.
- [116] STEVENEL (L.) - Le principe actif de l'huile de chaulmoogra. Bull. Soc. path. exot. 1929, 22, 338.
- [117] STRAIN (H.H.) Carotène VIII - Séparation of Carotènes by adsorption. J. Biol. Chem. 1934, 105, 523-535.
- [118] TIHON (L.) - Contribution à l'étude des huiles indigènes du Congo Belge (Caloncoba). Bull. Agr. Congo Belge 1935, 25, 313.
- [119] TISSEUIL (J.) et RIVOALEN (P.) - Action des dérivés du beurre de Gorli : esters éthyliques des glycérides solides, glycérides liquides, insaponifiables, en injections intradermiques au niveau des tâches tuberculoïdes. Bull. Soc. Path. exot. 1938, 31, 819.
- [120] VELTEN (J.P.) - Essai de recensement des lépreux dans le monde et traitement actuellement utilisé contre la lèpre. Thèse med. Paris 1952.
- [121] VIEUX (A.S.) - De l'extraction de l'huile de germe de maïs par les solvants organiques usuels notamment par l'éthanol et le traitement au moyen de ce solvant, par le procédé liquide-liquide d'une huile brute. Thèse Sc. Paris 1959.
- [122] WARBURG (O.) - Flacourtiaceae in ENGLER (A.) et PRANTL (K.). Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig 1894-1897, 111, 6 A, 1-56 et supplément p. 251.
- [123] WILDEMAN (E. De) - Sur les plantes à huile chaulmoogrique du Congo Belge. Bull. Inst. Roy. Col. Belge 1930, 1, 94-111.
- [124] WILDEMAN (E. De) et PIERAERTS - Sur les Hydnocarpus à huile chaulmoogrique cultivés au Congo Belge. Bull. Inst. Roy. Col. Belge. 1930, 1, 303-312.
- [125] WOLF (H.H. De) et KOLDEWIJN (H.B.) Over her vet van Hydnocarpus alpina Pharm. Weekbl 1912, 49, 1049-1050.
- [126] WRENSHALL (R.) et DEAN (A.L.) - Fractionation of chaulmoogra oil II evidence of the existence of a highly unsaturated optically active acid. US Publ. Health Serv. Bull. 1924, 141, 12-23.
- [127] ZECHMEISTER (L.) - Cis-trans isomerization and stereachemistry of Carotinoids and diphénylpolylènes. Chem. Rev. 1944, 34, 267-344.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
AVANT-PROPOS	IX
INTRODUCTION - LES HUILES DE CHAULMOOGRA ET LE TRAITEMENT DE LA LEPRE	1
<u>PREMIERE PARTIE</u>	
CARACTERES DES HUILES DE CHAULMOOGRA ET DE LEURS DERIVES DESTINES A L'USAGE OFFICINAL	5
A - Les huiles de chaulmoogra dans les pharmacopées	5
B - La composition chimique des huiles de Chaulmoogra	6
C - Le siège de l'activité thérapeutique	8
D - Détermination de la constitution chimique et de l'activité thérapeutique des huiles antiléprieuses	10
E - Techniques et méthodes utilisées	12
<u>DEUXIEME PARTIE</u>	
LES FLACOURTIACEES AFRICAINES PRODUCTRICES D'HUILES DE CHAULMOOGRA	13
CHAPITRE I - HISTORIQUE DE LA RECHERCHE ET DE LA PRODUCTION DES ESPECES CHAULMOOGRIQUES AFRICAINES ...	13
CHAPITRE II - ETUDE BOTANIQUE ET CHIMIQUE DES ESPECES AFRICAINES	16
A - Classification et Caractères Botaniques des espèces productrices d'huiles de Chaulmoogra	16
B - Les espèces du genre Caloncoba et leurs huiles	17
1 - Caractères botaniques et classification	17
2 - Caloncoba echinata	18
3 - Caloncoba Welwitschii	18
4 - Caloncoba glauca	22
C - Les graines et l'huile de Camptostylus Mannii	25
D - Conclusions	26

TROISIEME PARTIE

EXTRACTION DES HUILES DE CHAULMOOGRA PAR L'ETHANOL BOUILLANT ET PREPARATION DE LEURS ESTERS ETHYLIQUES ..	29
---	----

TITRE 1 : PREPARATION DES HUILES

CHAPITRE I - RECHERCHE D'UNE METHODE D'EXTRACTION	29
A - La préparation actuelle des huiles antiléprouses	29
B - Choix d'un solvant	29
C - Historique de l'extraction par l'alcool	30
CHAPITRE II - MARCHE DE L'EXTRACTION	32
A - Méthode d'extraction employée	32
B - Rendement de l'extraction	32
C - Observation du phénomène	34
1 - Pendant l'extraction	34
2 - Pendant le refroidissement	34
D - Séparation des différents constituants	35
1 - Séparation de la fraction lipidique	35
2 - Séparation de la phase intermédiaire	35
3 - Séparation de la phase alcoolique	35
CHAPITRE III - ETUDE COMPAREE DES LIPIDES EXTRAITS PAR L'ETHANOL ET PAR L'ETHER DE PETROLE	36
A - Rendement	36
B - Indice d'acide	38
C - Indice d'iode et déviation polarimétrique	38
CHAPITRE IV - ANALYSE DES GLYCERIDES NEUTRES ET DES LIPIDES ACIDES	40
A - Acides gras et glycérides	40
1 - Préparation et analyse des lipides acides	40
- Préparation des lipides acides	40
- Analyse des lipides acides	40
- Discussion des résultats	41
- Généralisation des résultats	42
2 - Interprétation des résultats	43
- Les glycérides	43
- Les acides gras et les acides oxydés	44
- Conclusions	44
3 - Répartition des divers constituants des lipides totaux (acides gras et glycérides) entre les phases liquide et solide, en fonction de divers facteurs	46
- Répartition en fonction de la quantité d'alcool	46
- Répartition en fonction du temps d'extraction	47
- Répartition en fonction de l'acidité libre des lipides de la graine oléagineuse	47
B - Matières insaponifiables et phosphoaminolipides	48
1 - Répartition des matières insaponifiables entre les deux phases résultant de l'extraction alcoolique	48

	Pages
2 - Etude des pigments	50
3 - Les phosphoaminolipides	54
C - Conclusions	56
CHAPITRE V - ETUDE CINETIQUE DE L'EXTRACTION ET DE LA CRISTALLISATION SPONTANEE DES GLYCERIDES DANS L'ALCOOL	
A - Extraction de Caloncoba Welwitschii	57
1 - Mode opératoire utilisé	57
2 - Vitesse et rendement de l'extraction	57
3 - Caractères physiques et chimiques des fractions	59
4 - Analyse des résultats	61
- Les graisses amorphes	61
- Les cristaux de première récolte	61
- Les cristaux de deuxième récolte	62
- Les lipides acides	62
5 - Conclusions	62
B - Extraction de Caloncoba echinata et généralisation des résultats	63
1 - Mode opératoire utilisé	63
2 - Comparaison entre la vitesse des deux extractions	64
3 - Caractères chimiques des fractions	65
4 - Influence du mode de refroidissement du miscella sur la cristallisation des lipides	66
C - Enrichissement des glycérides en acides optiquement actifs ..	66
CHAPITRE VI - ETUDE DES CONSTITUANTS NON LIPIDIQUES DE LA PHASE ALCOOLIQUE	
A - Recherche des glucides	68
B - Recherche des protides	68
C - Dérivés phosphorés	69
D - Autres constituants	69
E - La phase intermédiaire	69
TITRE 2 : PREPARATION DES ESTERS ETHYLIQUES	70
CHAPITRE I - LES PRINCIPALES FORMES D'UTILISATION DES MEDICAMENTS CHAULMOOGRIQUES DANS LE TRAITEMENT DE LA LEPRE	
A - Les huiles de Chaulmoogra	71
B - Les acides et leurs sels	72
C - Les esters éthyliques	72
CHAPITRE II - LA PREPARATION DES ESTERS ETHYLIQUES	
A - La préparation actuelle des esters	74
B - Nouvelle méthode de préparation des esters	75
1 - Extraction et estérification	75
2 - Séparation et purification	75
3 - Rendement en esters	76
4 - Nouvelle amélioration de la méthode	76
C - Conclusions	77

QUATRIEME PARTIE

LA PREPARATION DES DERIVES RICHES EN ACIDE GORLIQUE ...	79
CHAPITRE I - LES METHODES UTILISEES POUR L'EXTRACTION DE L'ACIDE GORLIQUE	79
CHAPITRE II - FRACTIONNEMENT DES ESTERS ETHYLIQUES PAR DISTILLATION	81
CHAPITRE III - SEPARATION DES GLYCERIDES PAR CRISTALLISA- TION FRACTIONNEE ET ESSAIS DE TRANSESTERIFICATION DIRIGEE	85
A - Cristallisation fractionnée des glycérides	85
1 - Constitution théorique du "beurre de Gorli"	85
2 - Cristallisation fractionnée des glycérides du "beurre de Gorli"	87
3 - Cristallisation fractionnée des lipides de Caloncoba glauca (Cameroun) et de Caloncoba Welwitschii (Gabon). ..	88
4 - Conclusions	88
B - Utilisation de solvants sélectifs	89
C - Transestérification dirigée des glycérides du Gorli	89
1 - Principe de la méthode	89
2 - Mode opératoire utilisé	89
3 - Essai de transestérification du "Beurre de Gorli"	89
CHAPITRE IV - SEPARATION DE L'ACIDE GORLIQUE A PARTIR DU MELANGE DES ACIDES GRAS DES HUILES DE CALON- COBA	92
A - Discussion des principales méthodes de séparation	92
B - Séparation des acides gras par cristallisation fractionnée ...	93
1 - Etude du fractionnement des acides gras du Beurre de Gorli	93
2 - Généralisation de la méthode et discussion	95
C - Fractionnement des complexes acides gras-urée	96
1 - Historique et principe de la méthode	96
2 - Fractionnement des acides gras de l'huile de Caloncoba Welwitschii	97
- Première technique opératoire utilisée	97
- Etude des résultats	98
- Deuxième technique opératoire utilisée	98
- Discussion des résultats	99
3 - Fractionnement des acides gras de Caloncoba echinata .	100
4 - Critique de la méthode	101
5 - Application de la méthode aux esters éthyliques	101
CONCLUSIONS GENERALES	103
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	107

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

LES SULFONES DANS LA THERAPEUTIQUE ANTILEPREUSE

Vu et approuvé
Nancy, le 20 Octobre 1959
Le Doyen de la Faculté,
F. KAYSER

Vu,
Nancy, le 20 Octobre 1959
Le Président de thèse,
M. Th. FRANÇOIS

Vu et permis d'imprimer
Nancy, le 21 Octobre 1959
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
G. MAYER

IMP. LOUIS-JEAN — GAP

Depôt légal n°1 84 — 1960

